



**Gonçalo Ribeiro**  
**Roberto Gonzaga**

**Nitro- e aminoflavonas como agentes antibacterianos**



**Gonçalo Ribeiro**  
**Roberto Gonzaga**

## **Nitro- e aminoflavonas como agentes antibacterianos**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica com especialização em Bioquímica Clínica, realizada sob orientação da Professora Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto, Professora Auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e do Professor Doutor Artur Manuel Soares Silva, Professor Catedrático no Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



universidade  
de aveiro

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão.

## **o júri**

presidente

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Rita Maria Pinho Ferreira**

Professora auxiliar no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

**Prof. Doutor Artur Manuel Soares Silva**

Professor Catedrático no Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

**Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria Emília da Silva Pereira Sousa**

Professora auxiliar na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

## **agradecimentos**

Durante a realização desta dissertação de Mestrado, bem como em todo o meu percurso acadêmico até à data, pude contar com o apoio e incentivo de diversas pessoas, sem as quais este trabalho nunca se teria tornado realidade. A todas essas pessoas, deixo aqui os meus sinceros agradecimentos.

Aos meus orientadores, a Professora Doutora Diana Cláudia Gouveia Alves Pinto e o Professor Doutor Artur Manuel Soares da Silva, pelo seu apoio e total disponibilidade tanto para esclarecer dúvidas como para resolver todos os problemas que foram surgindo pelo caminho.

Ao Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva e ao seu doutorando Mauro Diogo Batista dos Santos, pela possibilidade de realizar os testes de atividade antibacteriana e por toda a ajuda disponibilizada durante o processo.

Ao coordenador de Mestrado em Bioquímica, o Professor Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues, pela oportunidade de frequentar este Mestrado que em muito contribui para o enriquecimento da minha formação académica e científica.

À Ana, pela paciência e carinho com que me aturou e pelo modo como sempre me apoiou, acompanhou e incentivou diariamente ao longo desta etapa. Pelas críticas e conselhos que me guiaram para o caminho certo e pelas alegrias e momentos felizes que fizeram com que mantivesse nele.

À minha Família, em especial aos meus Pais, ao meu Irmão e à minha Madrinha, por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por todos os ensinamentos de vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que constantemente me oferecem.

Finalmente, aos meus amigos, por me acompanharem e estarem sempre presentes, tornando inesquecíveis os momentos de folga e descontração e oferecendo apoio incondicional em momentos de trabalho. Cara a cara ou à distância, foram eles que tornaram esta etapa como uma das etapas que recordarei com mais carinho.

## palavras-chave

Flavonas, 2'-hidroxicalconas, anel  $\beta$ -lactâmico, atividade antibacteriana, condensação aldólica, ciclodesidrogenação.

## resumo

Os flavonoides são um grupo extenso de compostos naturais presentes na Natureza, em particular nas plantas. Este tipo de compostos já demonstraram em várias instâncias possuir atividades biológicas muito diversas, desde atividade antioxidante, anticancerígena e até antibacteriana. Dos compostos pertencentes a esta família e que apresentam atividade antibacteriana destacam-se as flavonas. Na literatura, estão descritos vários mecanismos através dos quais elas exercem a sua capacidade bactericida. Para além disso, estas apresentam também a capacidade de atenuar a patogenicidade de várias bactérias.

Face ao crescente número de espécies bacterianas resistentes a antibióticos, às potencialidades do núcleo de flavona e à reconhecida importância da presença de um anel  $\beta$ -lactâmico idealizou-se a síntese de flavonas contendo um anel  $\beta$ -lactâmico como substituinte e a avaliação da sua atividade antibacteriana.

Assim sendo o trabalho descrito nesta dissertação envolve num primeiro passo a síntese de 2'-hidroxinitrocalconas através de uma reação de condensação aldólica entre 2'-hidroxiacetofenonas e benzaldeídos convenientemente substituídos. Estas são em seguida sujeitas a uma reação de ciclodesidrogenação, catalisada por iodo, originando as respetivas nitroflavonas, que por redução do grupo nitro originam as aminoflavonas.

As aminoflavonas foram usadas como substratos em diversos estudos de reações de Reformatsky, com o objetivo de sintetizar os derivados contendo o anel  $\beta$ -lactâmico.

Os compostos sintetizados foram todos caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mono (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e bidimensional (HSQC e HMBC).

Em seguida descrevem-se os resultados obtidos na avaliação da atividade antibacteriana de derivados de flavona e 2'-hidroxicalcona. Os resultados mostram que alguns derivados apresentam atividade antibacteriana, como sejam os casos da 2'-hidroxi-3'-nitrocalcona (MIC = 64  $\mu\text{g/mL}$ ), da 4-amino-2'-hidroxicalcona (MIC = 16  $\mu\text{g/mL}$ ), da 8-aminoflavona (MIC = 32  $\mu\text{g/mL}$ ) e da 8-nitroflavona (MIC = 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

No final são apresentadas as conclusões gerais e apresentadas propostas para trabalhos futuros.

**keywords**

Flavones, 2'-Hydroxychalcones,  $\beta$ -lactam ring, antibacterial activity, aldol condensation, cyclodehydrogenation.

**abstract**

Flavonoids are an extensive group of natural compounds present throughout nature, particularly in plants. This type of compounds revealed in several instances to have very different biological activities that range from antioxidant, anticancer and antibacterial activity. From the compounds belonging to this family that showed antibacterial activity, flavones can be highlighted. In the literature, there are described several mechanisms by which they exert their bactericidal capacity. In addition, they also have the capacity to attenuate the pathogenicity of several bacteria.

The growing number of bacterial species resistant to antibiotics, the potential of the flavone nucleus and the recognised role of the  $\beta$ -lactam ring in antibiotics, prompted us to synthesize flavones containing a  $\beta$ -lactam ring and evaluate their antibacterial activity.

Therefore the work described in this dissertation reports the synthesis of 2'-hydroxynitrochalcones through an aldol condensation of 2'-hydroxyacetophenones with benzaldehydes. These 2'-hydroxychalcones are then subjected to a cyclodehydrogenation, catalysed by iodine, giving the respective nitroflavones that will be further transformed into aminoflavones through reduction of the nitro group.

The aminoflavones were used in several studies involving Reformatsky reaction conditions, aiming the synthesis of flavones with a  $\beta$ -lactam ring.

All synthesized compounds were characterised using mono ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$ ) and bidimensional (HSQC and HMBC) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

Next the antibacterial evaluations are described emphasizing the good activity showed by several compounds such as 2'-hydroxy-3'-nitro-chalcone (MIC = 64  $\mu\text{g/mL}$ ), 4-amino-2'-hydroxychalcone (MIC = 16  $\mu\text{g/mL}$ ), 8-aminoflavone (MIC = 36  $\mu\text{g/mL}$ ) and 8-nitroflavone (MIC = 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

At the end of this dissertation some conclusions of this work and future perspectives will be presented.

## **Índice**



# Índice de conteúdos

Introdução .....	1
1. Flavonas .....	3
1.1. Flavonas como compostos biologicamente ativos .....	5
1.2. Flavonas como agentes antibacterianos .....	10
1.2.1. Relação estrutura-atividade antibacteriana das flavonas e isoflavonas .....	10
1.2.2. Mecanismos de ação antibacteriana .....	11
1.2.3. Mecanismos de atenuação da patogenicidade bacteriana .....	14
2. Compostos $\beta$ -lactâmicos .....	15
3. Flavonas conjugadas com anéis $\beta$ -lactâmicos .....	17
4. Objetivos .....	18
Material e Métodos .....	21
1. Materiais .....	23
2. Métodos de síntese .....	24
1.1. Síntese de 2'-hidroxinitroacetofenonas 2a-b .....	24
1.2. Síntese de 2'-hidroxinitrocalconas 4a-c .....	24
1.3. Síntese de nitroflavonas 5a-c .....	25
1.4. Síntese de aminoflavonas 6a-c .....	26
1.5. Síntese de amidoflavonas 11a-c .....	26
1.6. Síntese da 6-acrilamidoflavona 14 .....	27
1.7. Síntese de 2'-hidroxiaminocalconas 13a e 13c e de 2'-hidroxiaminodi- hidrocalconas 15a e 15c .....	27
1.8. Síntese da 6-aminoflavanona 16 e da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15a28	
3. Atividade Antibacteriana .....	29
1.1. Método de diluição no agar .....	29
1.1.1. Materiais .....	29
1.1.2. Procedimento .....	29

Resultados.....	31
1. Caracterização dos compostos sintetizados .....	33
1.1. 2'-Hidroxinitroacetofenonas .....	33
2'-Hidroxi-3'-nitroacetofenona (2b) .....	33
2'-Hidroxi-5'-nitroacetofenona (2c) .....	34
1.2. (E)-2'-Hidroxicalconas.....	35
(E)-2'-Hidroxi-3'-nitrocalcona (4a) .....	35
(E)-2'-Hidroxi-5'-nitrocalcona (4b).....	36
(E)-2'-Hidroxi-4-nitrocalcona (4c) .....	37
(E)-3'-Amino-2'-hidroxicalcona (13a) .....	38
(E)-4-Amino-2'-hidroxicalcona (13c).....	39
1.3. 2'-Hidroxi-di-hidrocalconas .....	40
3'-Amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15a) .....	40
5'-Amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15b).....	41
4-Amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15c) .....	42
1.4. Flavanonas.....	43
6-Aminoflavanona (16) .....	43
1.5. Flavonas .....	44
8-Nitroflavona (5a).....	44
6-Nitroflavona (5b) .....	45
4'-Nitroflavona (5c) .....	46
8-Aminoflavona (6a).....	47
6-Aminoflavona (6b).....	48
4'-Aminoflavona (6c).....	49
3-Bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-8-il)propanamida (11a) .....	50
3-Bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)propanamida (11b) .....	51

3-Bromo- <i>N</i> -[4-(4-oxo-4 <i>H</i> -cromen-2-il)fenil]propanamida (11c) .....	52
<i>N</i> -(4-Oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)acrilamida (14) .....	53
2. Atividade antibacteriana .....	54
Discussão .....	55
1. Síntese das 2'-hidroxiacetofenonas, ( <i>E</i> )-2'-hidroxicalconas, 2'-hidroxidi- hidrocalconas, flavonas e flavanona. ....	57
2. Caracterização das 2'-hidroxiacetofenonas, ( <i>E</i> )-2'-hidroxicalconas, 2'-hidroxidi- hidrocalconas, flavonas e flavanona. ....	59
3. Atividade Antibacteriana .....	66
Conclusão .....	69
Bibliografia.....	73

## Índice de Figuras

Figura 1 – Principais classes de flavonoides [3].....	3
Figura 2 – A flavona crisina, com os respetivos nomes (comum, semi-sistemático e sistemático).....	4
Figura 3 – Estruturas da Galangina, Pinobembrina e Quercetagetina-7-Arabinosilgalactosídeo .....	4
Figura 4 – Estruturas da 7-Hidroxiflavona, Apigenina, Baicalina, Eupafolina, Nobiletina e Escutelareína .....	5
Figura 5 – Estruturas de várias flavonas hidroxiladas, da 8-Acetilflavona, Fisetina, Flavopiridol, Hipolaetina, Luteolina e Quercetina .....	7
Figura 6 – Derivados da combrestatina .....	8
Figura 7 – Estruturas de vários flavonoides com atividades biológicas .....	9
Figura 8 – Estrutura de flavonas polimetoxiladas .....	12
Figura 9 – Estruturas da Diosmina, 3- <i>O</i> -octanoil(-)-epicatequina, Galangina e SD8 .....	13
Figura 10 – Dois mecanismos pelos quais as flavonas podem diminuir o número de unidades formadoras de colónias (CFU) [94].....	14
Figura 11 – Anel $\beta$ -lactâmico (a vermelho) de uma molécula de penicilina. R é o grupo variável. ....	15
Figura 12 – Flavonas a sintetizar.....	17
Figura 13 – Estrutura e constantes de acoplamento da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona (2b).....	33
Figura 14 – Estrutura e constantes de acoplamento da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona (2c).....	34
Figura 15 – Estrutura e constantes de acoplamento da ( <i>E</i> )-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona (4a).....	35
Figura 16 – Estrutura e constantes de acoplamento da ( <i>E</i> )-2'-hidroxi-5'-nitrocalcona (4b) .....	36
Figura 17 – Estrutura e constantes de acoplamento da ( <i>E</i> )-2'-hidroxi-4'-nitrocalcona (4c).....	37
Figura 18 – Estrutura e constantes de acoplamento da ( <i>E</i> )-3'-amino-2'-hidroxicalcona (13a) .....	38
Figura 19 – Estrutura e constantes de acoplamento da ( <i>E</i> )-4'-amino-2'-hidroxicalcona (13c).....	39
Figura 20 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15a).....	40
Figura 21 – Estrutura e constantes de acoplamento da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15b).....	41
Figura 22 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15c) .....	42
Figura 23 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-aminoflavanona (16) .....	43
Figura 24 – Estrutura e constantes de acoplamento da 8-nitroflavona (5a).....	44
Figura 25 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-nitroflavona (5b).....	45
Figura 26 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4'-nitroflavona (5c).....	46
Figura 27 – Estrutura e constantes de acoplamento da 8-aminoflavanona (6a) .....	47
Figura 28 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-aminoflavanona (6b) .....	48
Figura 29 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4'-aminoflavanona (6c) .....	49
Figura 30 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo- <i>N</i> -(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-8-il)propanamida (11a).....	50
Figura 31 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo- <i>N</i> -(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)propanamida (11b) ..	51
Figura 32 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo- <i>N</i> -[4-(4-oxo-4 <i>H</i> -cromen-2-il)fenil]propanamida (11c) ..	52
Figura 33 – Estrutura e constantes de acoplamento da <i>N</i> -(4-Oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)acrilamida (14) .....	53
Figura 34 – Efeito do grupo nitro na acidez do hidrogénio $\alpha$ -carbonílico .....	57
Figura 35 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona 2c .....	60
Figura 36 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 2'-hidroxi-5'-nitrocalona 4b .....	61
Figura 37 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 4'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15c.....	62
Figura 38 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 6-nitroflavona 5b (em cima) comparado com o mesmo tipo de espectro da 6-aminoflavanona 6b (em baixo).....	63
Figura 39 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da 3-Bromo- <i>N</i> -[4-(4-oxo-4 <i>H</i> -cromen-2-il)fenil]propanamida 11c.....	64
Figura 40 – Espectro de RMN $^1\text{H}$ da <i>N</i> -(4-Oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)acrilamida 14 .....	64
Figura 41 - Efeito dos grupos substituintes na MIC das calconas, para a <i>Escherichia coli</i> .....	66
Figura 42 - Efeito dos grupos substituintes na MIC das flavonas para a <i>Escherichia coli</i> .....	67

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades importantes calculadas para as estruturas bases 1a, 1b e 1c [129] .....	18
Tabela 2 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona 2b.....	33
Tabela 3 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona 2b.....	33
Tabela 4 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona 2c .....	34
Tabela 5 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona 2c.....	34
Tabela 6 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da (E)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona 4a.....	35
Tabela 7 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da (E)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona 4a.....	35
Tabela 8 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da (E)-2'-hidroxi-5'-nitrocalcona 4b .....	36
Tabela 9 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da (E)-2'-hidroxi-5'-nitrocalcona 4b .....	36
Tabela 10 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da (E)-2'-hidroxi-4-nitrocalcona 4c .....	37
Tabela 11 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da (E)-2'-hidroxi-4-nitrocalcona 4c.....	37
Tabela 12 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da (E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona 13a .....	38
Tabela 13 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da (E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona 13a .....	38
Tabela 14 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da (E)-4-amino-2'-hidroxicalcona 13c.....	39
Tabela 15 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da (E)-4-amino-2'-hidroxicalcona 13c .....	39
Tabela 16 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 3'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15a .....	40
Tabela 17 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 3'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15a.....	40
Tabela 18 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15b.....	41
Tabela 19 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15b.....	41
Tabela 20 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15c .....	42
Tabela 21 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15c .....	42
Tabela 22 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 6-aminoflavanona 16 .....	43
Tabela 23 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 6-aminoflavanona 16 .....	43
Tabela 24 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 8-nitroflavona 5a.....	44
Tabela 25 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 8-nitroflavona 5a.....	44
Tabela 26 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 6-nitroflavona 5b.....	45
Tabela 27 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 6-nitroflavona 5b.....	45
Tabela 28 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 6-nitroflavona 5c.....	46
Tabela 29 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 6-nitroflavona 5c.....	46
Tabela 30 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 8-aminoflavona 6a .....	47
Tabela 31 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 8-aminoflavona 5a .....	47
Tabela 32 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 6-aminoflavona 6b .....	48
Tabela 33 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 6-aminoflavona 6b .....	48
Tabela 34 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 4'-aminoflavona 6c .....	49
Tabela 35 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 4'-aminoflavona 6c .....	49
Tabela 36 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 3-Bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-8-il)propanamida 11a.....	50
Tabela 37 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 3-Bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-8-il)propanamida 11a .....	50
Tabela 38 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da 3-bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)propanamida 11b .....	51
Tabela 39 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da 3-bromo-N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)propanamida 11b.....	51
Tabela 40 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ do 3-bromo-N-[4-(4-oxo-4 <i>H</i> -cromen-2-il)fenil]propanamida 11c.....	52
Tabela 41 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ do 3-bromo-N-[4-(4-oxo-4 <i>H</i> -cromen-2-il)fenil]propanamida 11c.....	52
Tabela 42 – Desvios químicos de RMN de $^1\text{H}$ da N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)acrilamida 14.....	53
Tabela 43 – Desvios químicos de RMN de $^{13}\text{C}$ da N-(4-oxo-2-fenil-4 <i>H</i> -cromen-6-il)acrilamida 14.....	53
Tabela 44 – MICs das (E)-2'-hidroxicalconas e flavanona na <i>Escherichia coli</i> .....	54
Tabela 45 – MICs das flavonas na <i>Escherichia coli</i> .....	54

## **Abreviaturas**

## Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
APN/CD13	Aminopectidase N/ <i>cluster</i> de diferenciação 13 (AminoPeptidase N/Cluster of Differentiation 13)
ATP	Adenina trifosfato
CDK	Cinases dependentes de ciclina (Ciclin Dependent Kinases)
CFU	Unidades formadoras de colónias (Colony Forming Units)
$\delta$	Desvio químico
d	Duplete
dd	Duplo duplete
ddd	Duplo duplete de dupletos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massa
ESI	Ionização por electrospray (ElectroSpray Ionization)
FAS II	Via de biossíntese de ácidos gordos tipo II (type II fatty acid biosynthesis system)
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ -Aminobutyric Acid)
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (Human Immunodeficiency Virus)
HMBC	Correlação espectroscópica heteronuclear em RMN a longa distância (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlação espectroscópica heteronuclear em RMN (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
ICAM	Molécula de adesão intercelular (Intercellular Adhesion Molecule)
Int. rel.	Intensidade relativa
$J$	Constante de acoplamento

m	Multipleto
MBC	Concentração mínima bactericida (Minimum Bactericidal Concentration)
MIC	Concentração mínima inibitória (Minimum Inhibitory Concentration)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (Methicilin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> )
NAG	<i>N</i> -acetilglucosamina ( <i>N</i> -Acetylglucosamine)
NAM	Ácido <i>N</i> -acetilmuramico ( <i>N</i> -Acetylmuramic acid)
PBP	Proteína que se liga à penicilina (Penicillin-Binding Protein)
PPAR	Recetor ativado por proliferador de peroxissoma (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors)
Rf	Índice de retenção
RMN	Ressonância magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de protão
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13
RT	Temperatura ambiente (Room Temperature)
s	Singleto
SD 8	Simociclinona D8 (Simocyclinone D8)
t	Tripleto
td	Triplo dupleto
TFA	Acido trifluoroacético
THF	Tetra-hidrofurano
TLC	Cromatografia de camada fina (Thin Layer Chromatography)
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor)
UV	Ultravioleta
VacA	Citotoxina vacuolante A (VacuolatingCytotoxin A)



VCAM      Molécula de adesão de células vasculares (Vascular Cell Adhesion Molecule)

# **Introdução**



# 1. Flavonas

Os flavonoides (Figura 1), família de compostos à qual pertencem as flavonas, são universais no reino das plantas, podendo ser encontrados não só nos seus frutos, sementes, caules, flores e folhas [1] mas também no própolis e no mel [2]. Estes compostos são conhecidos por serem os principais responsáveis pelas diferentes cores das flores e pela mudança de cor das folhas durante o Outono. No entanto, são também responsáveis por um vasto leque de funções, como atrair insetos polinizadores [1,3], proteger a planta contra raios ultravioleta e fungos patogénicos [4,5]. Estão também envolvidos na ação de hormonas nas plantas e dos seus reguladores de crescimento, no controlo da respiração e fotossíntese e mesmo na determinação do sexo em ratos [1,4,6].

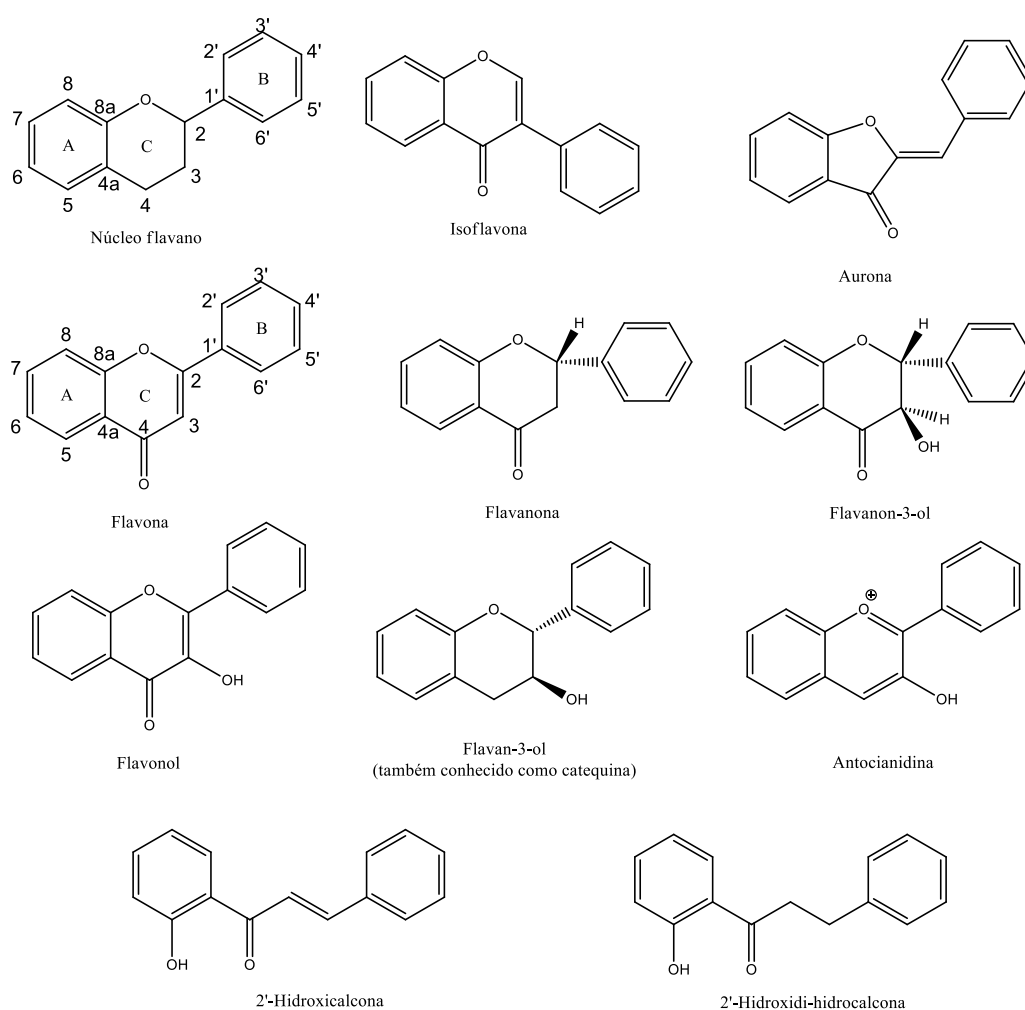


Figura 1 – Principais classes de flavonoides [3]

A estrutura básica comum aos flavonoides é o 2-fenilbenzopirano, ou núcleo flavano, que consiste em dois anéis benzénicos (A e B) unidos por um anel pirano (C) (Figura 1). Os flavonoides podem ser classificados de acordo com a sua origem biossintética. Algumas classes, como as 2'-hidroxicalconas e flavanonas, podem ser intermediários ou

produtos finais, que se acumulam nos tecidos vegetais. Outras são conhecidas como produtos finais de biossíntese, por exemplo as flavonas e os flavonóis. Existem ainda duas outras classes em que o grupo 2-arilo da flavanona isomeriza para a posição 3, dando origem às isoflavonas e isoflavonoides relacionados, ou para a posição 4 (duas isomerizações consecutivas), resultando nos neoflavonoides. No total, existem 14 classes de flavonoides, que diferem entre si pela natureza química e posição dos substituintes no anel A, B ou C [7] (Figura 1).

O nome para flavonoides individuais pode ser atribuído de três maneiras diferentes: (i) nomes comuns, que são os mais usados, indicam em alguns casos a classe do flavonoide ou a planta de origem (por exemplo, nomes acabados em “etina” geralmente referem-se a um flavonol e o nome “tricina” é o nome de um composto extraído de plantas do gênero *Triticum*); (ii) nomes semi-sistemáticos, que são baseados no nome comum da estrutura “mãe” (como 3,5,7,3',4'-penta-hidroxiflavona); e (iii) nomes sistemáticos, que são raramente usados, como 3,4-di-hidro-2-fenil-2*H*-1-cromen-4-ona [3] (Figura 2).

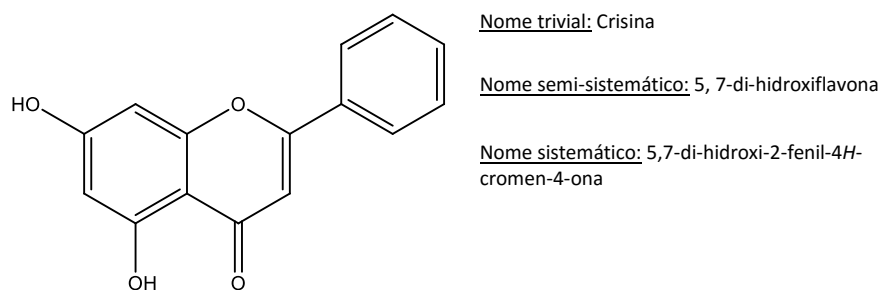


Figura 2 – A flavona crisina, com os respectivos nomes (comum, semi-sistemático e sistemático).

Preparações que contêm flavonoides como principal componente fisiologicamente ativo foram usadas por médicos e curandeiros, durante séculos. Por exemplo, infusões de folhas de plantas de *Tagetes minuta* (que contêm quercetagetina-7-arabinosilgalactosídeo – Figura 3) têm sido usadas, no folclore argentino, para tratar doenças intestinais e estomacais [8,9]. Do outro lado do globo, na Grécia Antiga, Hipócrates receitava pomadas de própolis [rico em flavonoides, como galangina e pinocembrina [10] (Figura 3)] para tratar ferimentos e úlceras [11], existindo mesmo referências do seu uso no Antigo Testamento [3]. Na Ásia, mais concretamente na China, Huang-chin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) rica em baicalina (Figura 4), a flavona responsável pelas suas propriedades antimicrobianas [12], tem sido usada sistêmica e topicamente durante milênios para tratar abscessos periodontais e feridas orais infetadas.

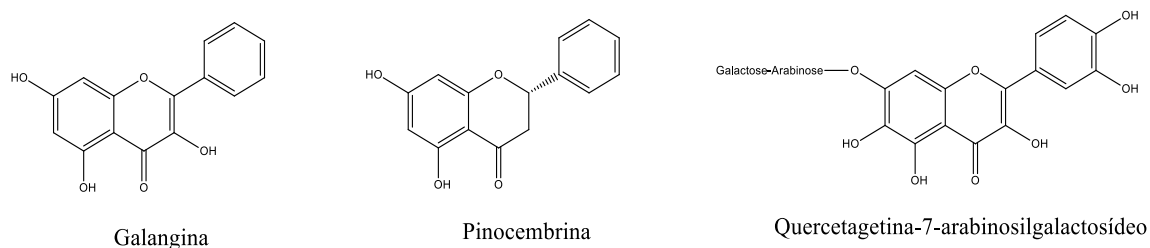


Figura 3 – Estruturas da Galangina, Pinobembrina e Quercetagetina-7-Arabinosilgalactosídeo

Estes e outros exemplos sugerem uma propensão dos compostos com um núcleo flavano em demonstrar variadas atividades biológicas. Consequentemente, os compostos da família dos flavonoides serão certamente compostos a ter em conta na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos.

### 1.1. Flavonas como compostos biologicamente ativos

Sendo uma das mais importantes classes da família dos flavonoides, as flavonas são responsáveis por muitas das propriedades atribuídas a esta família de metabolitos secundários, facto comprovado por vários estudos que revelaram diversas atividades biológicas das flavonas que podem vir a ser utilizadas para benefício do Homem. Por exemplo, a apigenina (Figura 4) demonstrou possuir características anti-aterogénicas, ao diminuir a expressão de proteínas que desempenham um papel importante na adesão celular, como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina induzida por TNF- $\alpha$  [13], impedindo assim a adesão de células às paredes dos vasos sanguíneos e ao seu espaço endotelial. Várias flavonas e isoflavonas demonstraram propriedades vaso-relaxantes, anti-plaquetárias e, possivelmente, anti-aterogénicas [14,15]. Outras flavonas, como a nobiletina (Figura 4) encontrada em citrinos, induzem a diferenciação de pré-adipócitos ST-13 em adipócitos maduros, o que leva ao aumento da produção de adiponectina, uma proteína com atividades anti-aterogénicas e sensibilizadoras de insulina [16].

Outros derivados de flavonas obtidos por síntese química, como derivados da 7-hidroxiflavona (Figura 4) e compostos análogos da crisina (Figura 2), exibem efeitos hipoglicémicos em ratos diabéticos [17,18]. As flavonas podem exibir este efeito anti hiperglicémico de várias formas:

- (i) Inibição da  $\alpha$ -amilase, como a escutelareína e a eupafolina (Figura 4), em animais [19], a luteolina (Figura 5) e a baicalina (Figura 4) [20,21];
- (ii) Inibição da glicogénio fosforilase, como a 6-hidroxiluteolina, a hipolaetina e a quercetagina (Figura 5) [22];
- (iii) Inibição da aldose redutase, como diferentes 3',4'-di-hidroxiflavonas (Figura 5) [23];
- (iv) Ativação de sirtuínas, como a luteolina, fisetina, quercetina, 3,6,3',4'-tetra-hidroxiflavona e 5,7,3',4',5'-penta-hidroxiflavona (Figura 5) [24].

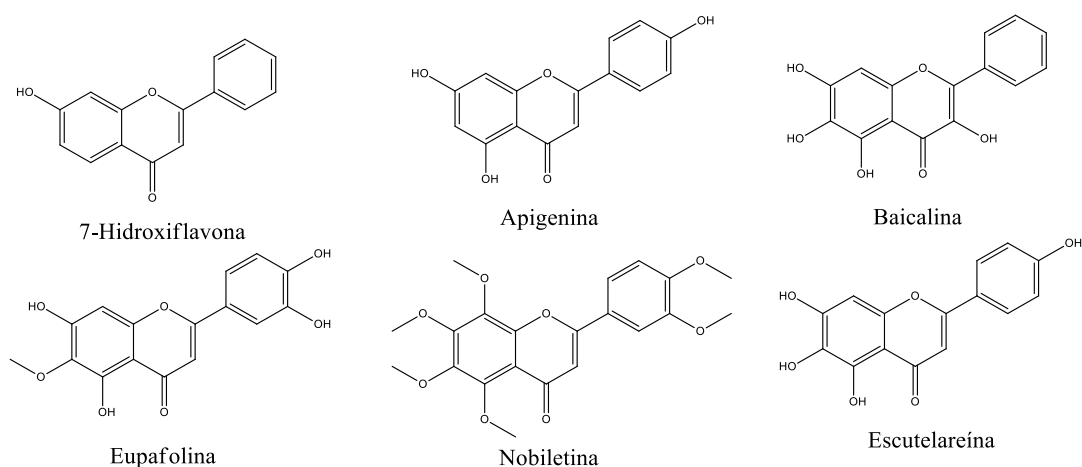


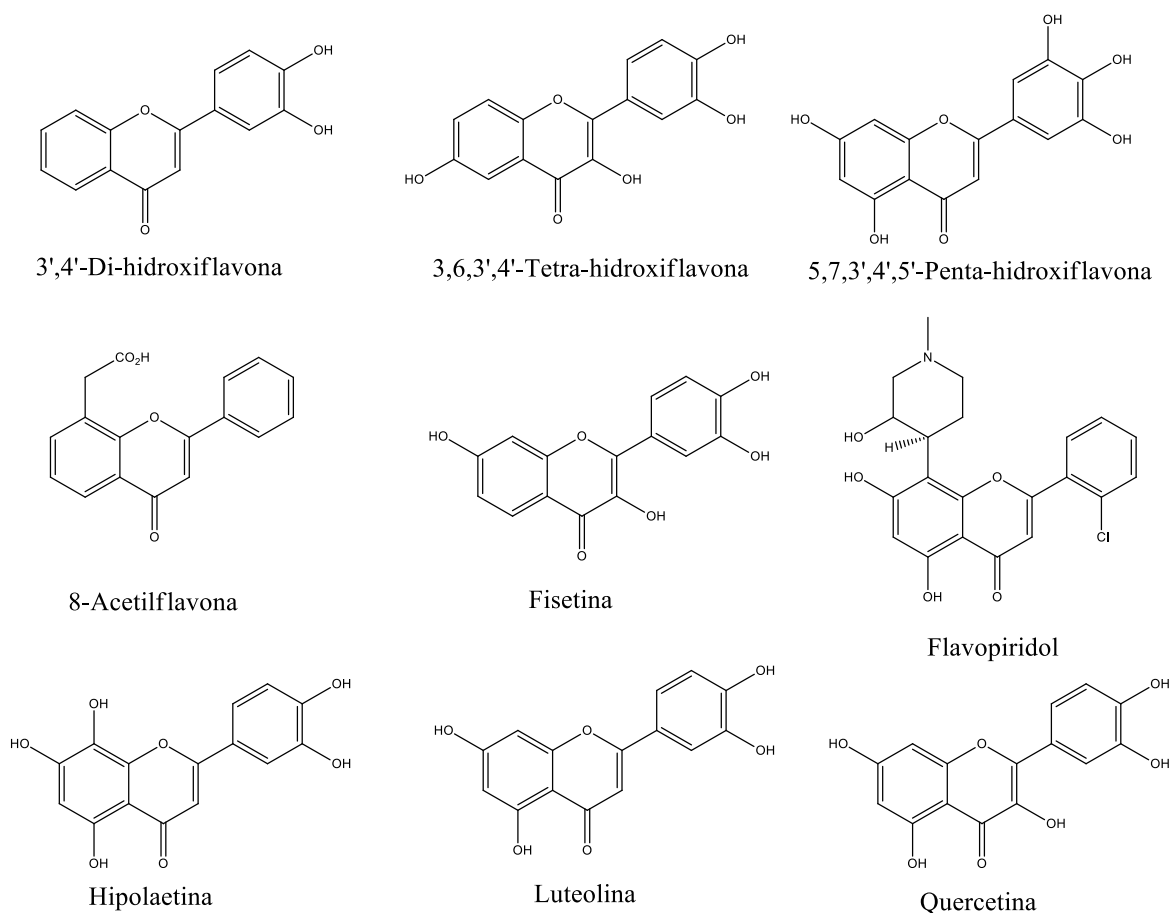
Figura 4 – Estruturas da 7-Hidroxiflavona, Apigenina, Baicalina, Eupafolina, Nobiletina e Escutelareína

As flavonas podem também interferir com processos chave do cancro, modulando um ou mais dos seguintes mecanismos:

- (i) Inibição da mitose, através da inibição de cinases dependentes de ciclina (CDKs). Diversos inibidores de CDKs, baseados em flavonas, entraram já em estudos clínicos contra diversos cancros [25]. O flavopiridol (Figura 5), por exemplo, é uma flavona sintética que inibe CDKs, induz a apoptose, suprime a inflamação e modula a resposta imunitária [26];
- (ii) Inibição da angionénese, através da inibição da APN/CD13, uma enzima chave deste processo. A 8-acetilflavona (Figura 5), juntamente com um derivado, exibiram inibição da APN *in vitro* [27] e quando testadas em ratos, mostraram-se eficazes na inibição do crescimento tumoral em 60-80% dos ratos. Contudo, quando testadas em humanos, estas flavonas não mostraram resultados promissores [28];
- (iii) Inibição da tirosina cinase. A luteolina (Figura 5) bloqueia competitivamente locais de ligação de ATP na unidade catalítica da proteína cinase C [29];
- (iv) Inibição da ornitina descarboxilase, que tem um papel regulador no crescimento celular. A 8-acetilflavona e a apigenina (Figuras 4 e 5) inibem ambas a ornitina descarboxilase [30,31];
- (v) Inibição da topoisomerase, envolvida em diversos processos celulares como a replicação, transcrição, recombinação, integração e segregação cromossomal [32]. A luteolina (Figura 5) é um inibidor potente da topoisomerase I eucariótica [33];
- (vi) Inibição da aromatase. A crisina (Figura 2), por exemplo, é um potente inibidor desta enzima mas a sua biodisponibilidade é baixa quando administrada oralmente (na dieta). Contudo, algumas metilflavonas são resistentes ao metabolismo e assim têm uma absorção intestinal alta [34];
- (vii) Inibição da polimerização da tubulina, uma proteína fundamental para a divisão celular. Flavonas derivadas da combretastatina A-14 (Figura 6) demonstraram atividade inibitória moderada desta proteína [35].

As flavonas podem atuar ainda como antioxidantes através de diferentes mecanismos. Podem:

- (i) Atuar quelando iões metálicos [36], inibindo a xantina oxidase, uma enzima ligada à criação de  $H_2O_2$  e aniões superóxidos [37,38];
- (ii) Inibindo a óxido nítrico sintase que, para além de ser responsável pela manutenção da dilatação dos vasos sanguíneos [39], pode ser induzida a produzir óxido nítrico em excesso e assim resultar em danos oxidativos. As flavonas inibidoras da óxido nítrico sintase II mais potentes são a apigenina e o kaempferol (Figura 4 e 7), que em quantidades micromolares inibem a sua transcrição genética [40];
- (iii) Algumas flavonas como a baicalina (Figura 4), podem ainda capturar radicais livres formados durante algumas transformações bioquímicas do etanol no fígado [41] e adicioná-los à ligação dupla carbono-carbono, atuando também como agente hepatoprotetor [42,43].

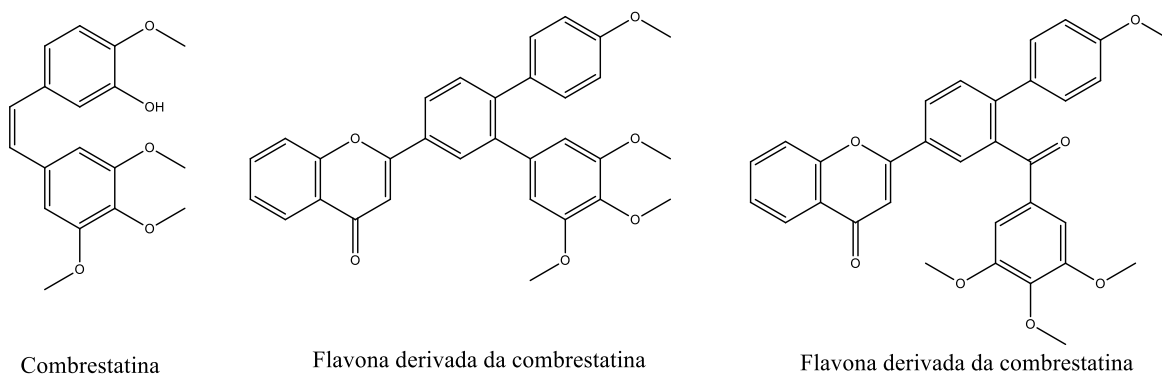


**Figura 5 – Estruturas de várias flavonas hidroxiladas, da 8-Acetilflavona, Fisetina, Flavopiridol, Hipolaetina, Luteolina e Quercetina**

Para além destas atividades existem outras que merecerem algum destaque, como:

- (i) Atividade hipolipidémica - está documentada uma relação entre a suplementação da dieta com polimetoxiflavonas encontradas em citrinos e o aumento da expressão das proteínas PPAR $\mu$  e PPAR $\gamma$  (recetores ativados por proliferadores de peroxissoma regulam, entre outros mecanismos, o metabolismo de lípidos) no fígado de hamsters resistentes à insulina [44];
- (ii) Atividade anti-inflamatória - a flavona crisina (Figura 2), agonista de PPAR- $\gamma$ , regula a produção de enzimas inflamatórias chave e da ciclo-oxigenase 2, diminuindo-a [45]. Outras flavonas, como as carboxiflavonas, apresentam a capacidade de modular significativamente a ação do leucotrieno D4 [46];
- (iii) Atividade antiespasmódica - flavonas anticolinérgicas como o flavoxato (Figura 7), que é usado para tratar espasmos da bexiga, têm efeitos anti muscarínicos [47]. Outro exemplo é o hidrocloreto de flavoxato (Figura 7) que é receitado para alívio da cistite intestinal, disúria, noctúria, dores supra-púbicas e incontinência, que podem ocorrer na cistite, prostatite e uretrite [48];
- (iv) Atividade anti-osteoporótica – a flavanona K 058 (Figura 7), isolada da *Ulmus wallichiana*, promove células osteoprogenitoras em ratos imaturos [18];





**Figura 6 – Derivados da combrestatina**

- (v) Atividade antiarrítmica - a flavona acacetina (Figura 7) prolonga a duração da ação em miócitos atriais humanos e também prolonga o período refratário efetivo em cães, prevenindo assim a indução de fibrilação atrial [49];
- (vi) Atividade antimicrobiana - a baicalina (Figura 4) inibe a replicação do HIV-1 em células mononucleares do sangue periferal, *in vitro* [50]. Esta flavona inibe também a transcriptase reversa do HIV-1 sem afetar as ADN polimerases- $\alpha$  e  $-\gamma$ , mas inibindo ligeiramente a polimerase- $\beta$  [51]. Por outro lado, a luteolina e quercetina (Figura 5) inibem o crescimento da promastigota da *Leishmania donovani* e induzem a paragem do ciclo celular na fase G1, levando à apoptose [52]. Várias hidroxiflavonas e derivados da 6-metoxi-2-(piperazin-1-il)-4H-cromen-4-ona (Figura 7) demonstraram possuir atividade contra *Aspergillus flavus*, uma espécie de fungo que causa doenças invasivas em pacientes imunossuprimidos [53,54];
- (vii) Atividade fotoprotetora - estudos demonstraram que certos flavonoides modificados são bons absorventes de luz UV com grande fotoestabilidade [18];
- (viii) Atividade antagonista de GABA - flavonas como a crisina (Figura 2), apigenina (Figura 4), wogonina (Figura 7) e 6-metilapigenina (Figura 4) apresentam efeitos ansiolíticos *in vitro*, sendo os efeitos sedativo, anticonvulsivo e relaxante muscular menos proeminentes, indicando uma possível ação mais seletiva destas moléculas [55];
- (ix) Atividade protetora da membrana celular - Uma vez que têm fragmentos lipo e hidrofílicos, as flavonas possuem a capacidade de interagir com bicamadas membranares [56]. Ao interagirem com as membranas induzem alterações que podem afetar a taxa de oxidação dos lípidos e proteínas membranares. Para além disso, a partição de flavonas no núcleo hidrofóbico pode resultar em atividade antioxidante ao estabilizar radicais livres, enquanto interações entre polifenóis na superfície da bicamada fosfolipídica, através de ligações de hidrogénio, podem reduzir o acesso à célula a moléculas prejudiciais à bicamada, protegendo a estrutura e funções da membrana;

- (x) Atividade inibidora da fosfodiesterase - o requisito estrutural mínimo para que um composto tenha atividade inibidora da fosfodiesterase é um esqueleto de flavona, de flavonol ou de antocianidina (Figura 1) [57];
- (xi) Atividade inibidora da oxidoreductase aceitadora de NAD(P)H-quinona – flavonas como a oroxilina, wogonina (Figura 7) e baicalina (Figura 4) catalisam a redução e desintoxicação de quinonas, levando à proteção celular contra toxicidade, mutagenicidade e cancro [58];
- (xii) Atividade agonista de recetores  $\alpha$ 1-adrenérgico - algumas flavonas, como a flavona SB 216469 (Figura 7), demonstram ter uma ação semelhante à dos agonistas de recetores  $\alpha$ 1-adrenérgico exógenos, pois demonstram seletividade urológica substancial em cães anestesiados, bloqueando a contração uretral ou estimulando o nervo hipogástrico [56, 57];
- (xiii) Atividade despigmentadora - certas flavonas são usadas na indústria cosmética, como a baicalina, que é usada como um agente despigmentador em cosméticos [18].

São abundantes os exemplos de atividades biológicas exibidas pelas flavonas (Figuras 1-7), o que em parte explica o interesse gerado à volta deste tipo de compostos. Mais à frente, iremos explorar uma atividade, não abordada nesta lista, que também é alvo de grande interesse por parte da comunidade científica: a atividade antibacteriana.

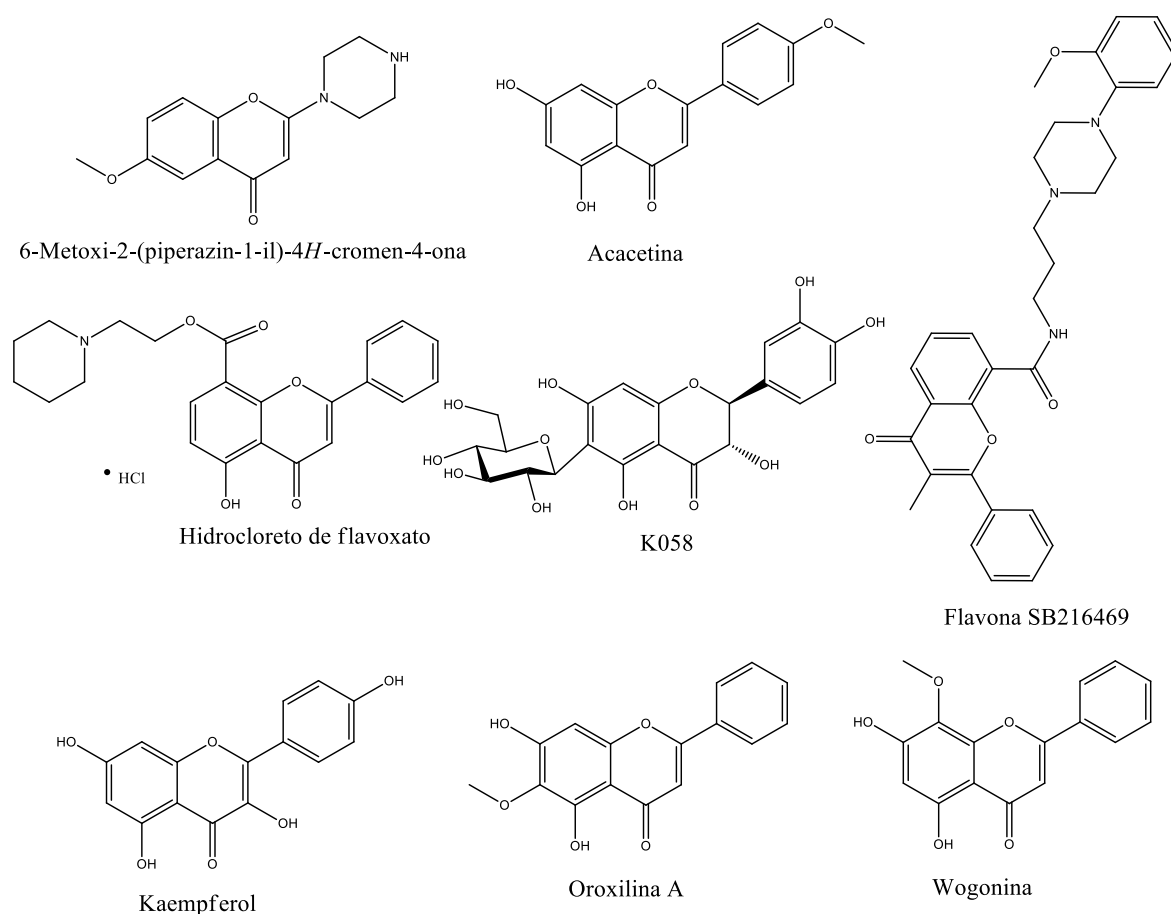


Figura 7 – Estruturas de vários flavonoides com atividades biológicas

## 1.2. Flavonas como agentes antibacterianos

No vasto leque de atividades biológicas associadas às flavonas, a atividade antibacteriana é certamente digna de estudos mais aprofundados dado o aumento do número de espécies bacterianas multirresistentes [61,62] e da necessidade de soluções para este problema à escala global, que passam pela descoberta de uma nova classe de agentes antibacterianos [63], pelo desenvolvimento de novos complementos que inibam os mecanismos de resistência [64] e pelo desenvolvimento de fármacos que tenham os fatores de virulência como alvo, interferindo com a patogénese bacteriana [65].

Na literatura, existem exemplos de flavonas que podem ajudar a combater espécies bacterianas multirresistentes. Por exemplo, a isoginkgetina mostrou atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*) com boa seletividade e baixa citotoxicidade [66], havendo mesmo estudos que afirmam que a luteolina e a apigenina (Figura 5 e 4), entre outras flavonas, são seletivamente tóxicas contra estirpes de *Streptococcus aureus* resistentes, designadas por MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina) [67,68]. Para além disto, a flavona baicalina (Figura 4) apresenta a capacidade de aumentar a atividade de antibióticos como a gentamicina em *Enterococcus* resistentes à vancomicina [69]. Outros estudos revelam que determinadas flavonas apresentam um efeito sinérgico, superior ao resultado da adição de cada atividade das flavonas isoladas [70], uma vez que podem facilitar a entrada do composto ativo na célula [71] ou impedir que este seja expelido por ela [72]. Por exemplo, a baicalina mostrou aumentar a atividade de fármacos  $\beta$ -lactâmicos [73].

Estes são apenas dois exemplos em como as flavonas podem vir a ser uma importante fonte de compostos úteis no tratamento de infeções causadas por espécies bacterianas multirresistentes.

### 1.2.1. Relação estrutura-atividade antibacteriana das flavonas e isoflavonas

Os estudos sobre a relação estrutura-atividade das flavonas podem ser agrupados em 3 grupos consoante o anel em que é estudado o impacto de diferentes grupos funcionais, no anel A, B ou C (Figura 1).

No anel A, vários autores demonstraram que a presença do grupo 5-hidroxilo aumenta a atividade de flavonas contra MRSA [74,75]. Foi também estabelecida uma relação entre a presença de uma cadeia *O*-acilo [76] ou *O*-alquilamino [77] na posição 7 e um aumento da atividade antibacteriana destes compostos. Para além disto, a presença de um grupo lipofílico na posição 6- ou 8- resulta num aumento da atividade antibacteriana contra MRSA e *Escherichia coli* [75,78]. Num estudo mais recente, Wu *et al.* afirmam que, em flavonas polimetoxiladas, um grupo 8-OMe contribui para um aumento da atividade antibacteriana [78]. No entanto, no mesmo estudo verificaram que o grupo 6-hidroxilo pode diminuir a atividade antibacteriana. Noutro estudo, Wu *et al.* verificou que a adição do grupo 6-amino (-NH<sub>2</sub>) resulta num aumento da atividade antibacteriana contra a bactéria *Clostridium difficile* [79]. A adição de átomos como flúor, cloro e bromo resultam também num aumento da atividade, segundo Mughal *et al.* [80].

No anel B, Sato *et al.* testaram, através de ensaios de difusão em agar, a atividade antibacteriana de isoflavonas com grupos hidroxilo nas posições 5-, 2'- e 4'- em várias espécies de *Streptococcus*. Os autores verificaram que estes compostos inibiam completamente o crescimento de bactérias [81]. Contudo, num estudo realizado pelo mesmo grupo afirma que 5-hidroxiflavonas e 5-hidroxiisoflavonas com grupos hidroxilo nas posições 7- e 4'- não exibem qualquer atividade [82]. Estes dados podem sugerir que a 2'-hidroxilação é importante para que o composto apresente atividade. Também a adição de um grupo 2'-OMe provou resultar num aumento da atividade antibacteriana contra *Clostridium difficile* [79]. Noutro estudo recente, Wu *et al.* revelou que o grupo 4'-OMe diminui a atividade antibacteriana de uma flavona metoxilada nas posições 5-, 6- e 7- (baicalina) [78]. Outro grupo funcional que está relacionado com um aumento da atividade antibacteriana, contra a *Escherichia coli*, é o grupo nitro (-NO<sub>2</sub>), Mughal *et al.* demonstraram que a adição deste grupo nas posições 2'-, 3'- e 3'-/4'- (simultaneamente) resulta num aumento do halo de inibição numa cultura de *Escherichia coli* [80]. No mesmo artigo, demonstraram também que um átomo de flúor na posição 4'- resultava também num aumento do halo de inibição numa cultura de *Escherichia coli*.

No anel C, Mughal *et al.* descobriram também que a substituição do átomo de oxigénio do carbonilo, por enxofre ou azoto é eficaz no melhoramento da atividade antibacteriana, contra a *Escherichia coli* [80]. Por outro lado, a adição de um grupo 3-hidroxilo (flavonol) está relacionada com um decréscimo da atividade antibacteriana contra o mesmo microrganismo, segundo Wu, *et al.* [78].

Estes dados sugerem que todos os anéis podem ser alterados de forma a aumentar e diminuir a atividade antibacteriana, não sendo possível identificar um deles como o principal responsável pela atividade bacteriana. Além disso, adição do mesmo substituinte pode resultar quer num aumento, quer numa diminuição na atividade antibacteriana apresentada pelo composto, dependendo da posição onde ele é colocado. Estes fenómenos podem ser explicados pelo facto de as flavonas atuarem através de diversos mecanismos quando em contato com bactérias. Desta forma, a análise da relação entre a estrutura e atividade das flavonas pode ser usado como uma ferramenta importante na compreensão dos mecanismos de ação destes compostos.

### **1.2.2. Mecanismos de ação antibacteriana**

#### ***Inibição da síntese de ADN***

Num estudo realizado por Ohemeng *et al.*, a apigenina (Figura 4) demonstrou a capacidade de inibir a enzima ADN girase da *Escherichia coli*, sendo que esta capacidade contribui para a sua propriedade antibacteriana [83]. Contudo, uma vez que o nível de atividade bactericida nem sempre se correlacionava com a inibição enzimática, os autores sugeriram que outros mecanismos estarão também envolvidos no processo bactericida. Outros estudos mais recentes têm apoiado estas conclusões, pois, para além da apigenina, outras flavonas como a baicalina (Figura 4), a crisina (Figura 2), a luteolina (Figura 5), a tangeritina (Figura 8), a nobiletina (Figura 4) e a 5,6,7,4'-tetrametoxiflavona (Figura 8) já demonstraram capacidade de inibir esta enzima bacteriana [78].

Outras flavonas, como análogos do composto natural SD8 baseados nas flavonas (Figura 9), também demonstram a capacidade de inibir a ADN girase [84]. Para além disso, um estudo realizado por Bernard *et al.* comprovou que é possível derivar inibidores seletivos da topoisomerase IV a partir da estrutura da flavona não substituída [85]. Ao interferirem com a função normal destas enzimas (ADN girase e topoisomerase IV) as flavonas apresentam a capacidade de interferir com a síntese de ADN bacteriano, revelando assim um dos mecanismos pelo qual estas exercem a sua atividade antibacteriana.

#### ***Alteração da membrana plasmática***

Num estudo recente, Yao *et al.* descobriram que algumas flavonas polimetoxiladas, como a nobiletina (Figura 4) e a tangeritina (Figura 8), têm a capacidade de alterar a permeabilidade seletiva de membranas celulares. Esta alteração resulta na perda de endoenzimas para o exterior, o que causa disfunções metabólicas, inibição da síntese proteica e eventualmente picnose e morte celular [86].

Outro estudo revelou que a apigenina (Figura 4) inibe competitivamente a enzima HpFabZ (proteína transportadora  $\beta$ -hidroxiacil-acildesidratase da *Helicobacter pylori*), que é responsável pelos ciclos de elongação de ácidos gordos saturados e não saturados na via de biossíntese de ácidos gordos tipo II (FAS II) [87,88]. A flavona inibe a enzima por uma de duas maneiras, liga-se à entrada do túnel B do substrato ou liga-se à enzima, dentro do túnel C, perto dos resíduos catalíticos [88]. Desta forma, torna-se impossível para a bactéria sintetizar ácidos gordos para incorporar na sua membrana plasmática.

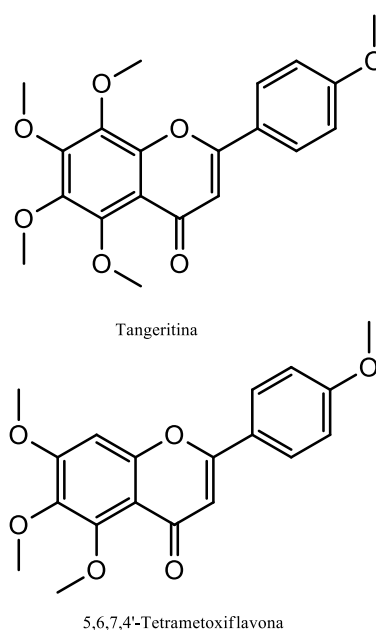
Estes estudos permitem concluir que as flavonas alteraram a membrana plasmática de várias formas. Elas podem simplesmente inibir a síntese da membrana [85, 86] ou mesmo causar alterações na sua permeabilidade, interferindo com a sua função [86].

#### ***Inibição da síntese da parede celular***

Dalei Wu *et al.* realizou um estudo que comprova que a flavona apigenina é um inibidor reversível da D-alanina-D-alanina ligase, competitivo em relação ao substrato ATP e não competitivo em relação ao substrato D-Ala [89]. Esta enzima é essencial uma vez que catalisa a ligação de D-Ala-D-Ala na montagem de precursores de peptidoglicano [90]. Uma vez que o peptidoglicano é um importante constituinte da parede celular, podemos afirmar que a apigenina é um composto inibidor da síntese da parede celular.

#### ***Inibição da produção de energia***

Um estudo realizado por Nagababy *et al.* [91] afirma que a baicalina inibe completamente a ATP sintase  $F_1$  presente na *Escherichia coli*. Outras flavonas como a crisina (Figura 2), a diosmina (Figura 9) e a apigenina (Figura 4) também inibem esta enzima, contudo a inibição é apenas parcial (40-60%) [91]. Uma vez que a ATP sintase é responsável, como o nome indica, pela produção de ATP, uma inibição completa desta



**Figura 8 – Estrutura de flavonas polimetoxiladas**

enzima significa que a bactéria torna-se incapaz de produzir energia para sustentar os mecanismos intracelulares que lhe permitem sobreviver.

Estes exemplos descritos na literatura permitem-nos concluir que as flavonas interferem em vários processos celulares das bactérias através de diferentes mecanismos. Podemos também concluir que as flavonas não estão limitadas a atuar através de apenas um mecanismo. A apigenina (Figura 4), por exemplo, demonstra capacidade de inibir a síntese de ADN [83], provocar alterações na membrana plasmática [88], inibir a síntese da parede celular [89] e diminuir a produção de energia [91]. Apesar de estes resultados demonstrarem propriedades bactericidas por parte de certas flavonas, é necessário ter em conta que outros estudos revelam que a 3-*O*-octanoil-(-)-epicatequina e o flavonol galangina (Figura 9) induzem a formação de agregados em diferentes estirpes de bactérias [92,93]. Se este fenómeno for induzido por outros flavonoides, como as flavonas, a diminuição de unidades formadores de colónias verificada em vários testes pode dever-se ao facto de as bactérias estarem agregadas e não à sua morte celular (Figura 10) [94]. Este fenómeno levanta algumas questões quanto aos mecanismos de ação propostos, pois a causa e efeito podem ter sido confundidos. Por exemplo, caso as bactérias se agreguem, a razão entre a sua área superficial e o seu volume diminuirá, levando a uma diminuição do consumo de oxigénio, podendo este sinal ser interpretado como paragem da cadeia transportadora de eletrões (ou seja, inibição da produção de energia). A razão área/volume diminuída pode também levar a um *uptake* reduzido de nutrientes como a uridina e timina, um sinal previamente interpretado como inibição da síntese de ácidos nucleicos. Uma solução provisória seria usar os estudos “time-kill” em detrimento dos ensaios de MBC, com análise microscópica das bactérias testadas [95].

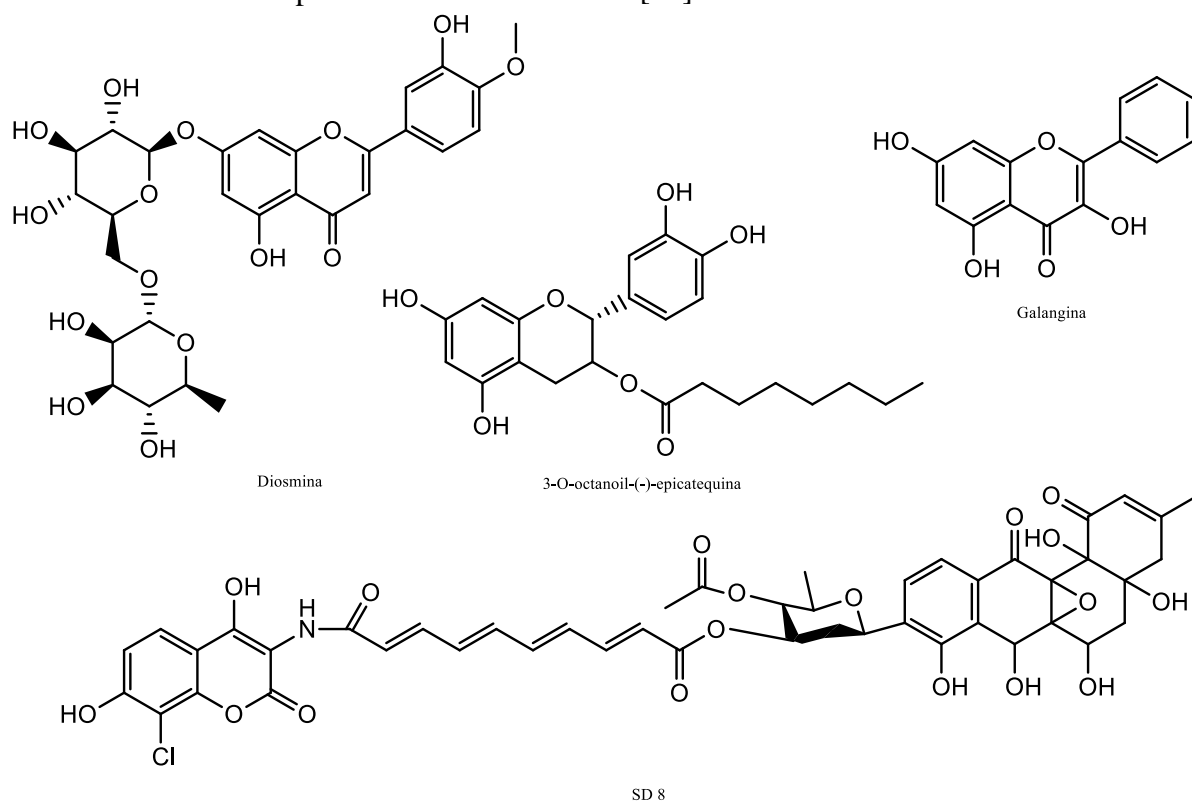
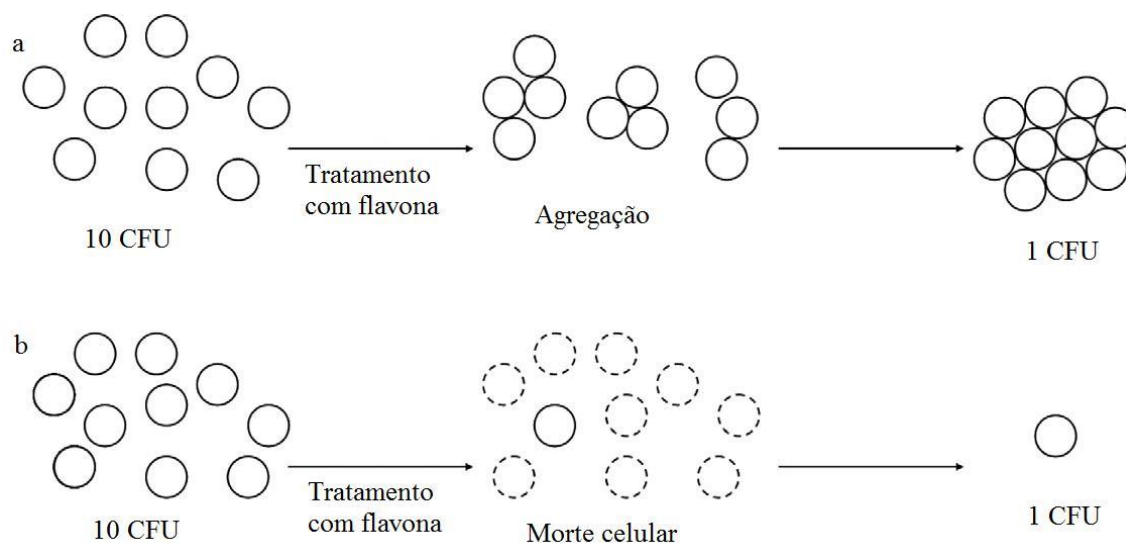


Figura 9 – Estruturas da Diosmina, 3-*O*-octanoil-(-)-epicatequina, Galangina e SD8



**Figura 10 – Dois mecanismos pelos quais as flavonas podem diminuir o número de unidades formadoras de colônias (CFU) [94]**

Além disso, pode dar-se o caso de um mecanismo de ação poder ser interpretado como vários outros. Num exemplo hipotético, dado por Cushnie *et al.*, um agente antibacteriano (neste caso o núcleo de uma flavona) pode danificar a membrana celular, o que levará à eliminação da força motriz protônica. Como consequência, a geração de ATP e o transporte de solutos para a célula bacteriana seriam afetados. Uma vez que a sua capacidade de gerar energia e adquirir nutrientes estava debilitada, a célula perderia a capacidade de sintetizar ADN, peptidoglicano para a parede celular e outros compostos [94].

### **1.2.3. Mecanismos de atenuação da patogenicidade bacteriana**

#### ***Inibição do recetor TraR***

Zeng *et al.* publicaram um estudo no qual afirmam que a baicalina (Figura 4) inibe o recetor TraR associado à membrana [96], um componente básico do sistema de *quorum sensing*, impedindo a interação entre lactonas da *N*-acil-homoserina (moléculas sinalizadoras usadas pelas bactérias Gram negativas) e os seus recetores [97]. *Quorum sensing* é um sistema de comunicação entre células que as bactérias usam para regular certos aspetos como a virulência. As bactérias libertam moléculas sinalizadoras que se ligam, nas células vizinhas, a recetores sensíveis à densidade celular, resultando na ativação de genes relacionados com a virulência [98]. Desta forma, a inibição do recetor TraR por parte da baicalina vai resultar numa diminuição da patogenicidade bacteriana.

#### ***Inibição da urease***

Vários estudos recentes revelam que certas flavonas conseguem inibir a enzima urease bacteriana [99–101]. Por exemplo, um estudo empreendido por Xiao *et al.* revelou que a crisina (Figura 2) é um potente inibidor reversível da urease presente na *Helicobacter pylori* com um mecanismo de ação não competitivo [102,103]. Tendo em conta que bactérias como a *Helicobacter pylori* segregam urease como mecanismo de defesa, para resistir ao pH baixo do estômago [94], a inibição desta enzima faz com que a sobrevivência

destas bactérias em determinados ambientes hostis seja reduzida, resultando numa baixa patogenicidade.

### ***Neutralização de toxinas bacterianas***

As toxinas desempenham um papel importante na patogenicidade das bactérias, chegando mesmo a causar doenças fatais muito tempo depois de a própria bactéria ter morrido [104]. Num estudo conduzido por Tomboloa *et al.*, foi descoberto que flavonas como a apigenina, a baicalina e a crisina (Figuras 4 e 2) inibem a toxina VacA, um dos principais fatores de virulência da bactéria *Helicobacter pylori* [105]. Esta toxina causa vacuolização celular e danos tecidulares ao formar canais permeáveis à ureia e seletivos para aniões em membranas plasmáticas e endossomais [106–109].

### ***Inibição da segregação de fatores virulentos***

A capacidade do *Streptococcus aureus* causar doenças é largamente atribuída à sua capacidade de segregar enzimas e toxinas [94]. Um estudo revelou que certas flavonas têm um impacto na segregação de fatores virulentos da bactéria *Streptococcus aureus* [110]. Fazem-no ao diminuir a produção da toxina  $\alpha$ -hemolisina, responsável pela lise de eritrócitos, e da estafiloxantina, cuja ação antioxidante ajuda a bactéria a sobreviver na presença de espécies reativas de oxigénio. Deste modo, as flavonas testadas por Lee *et al.* diminuíram a hemólise de eritrócitos humanos e o nível transcripcional do gene da  $\alpha$ -hemolisina, bem como tornaram a bactéria 100 vezes mais vulnerável ao peróxido de hidrogénio [110].

Apesar de serem agentes antibacterianos promissores, com MBC's baixos e com atividade sinérgica alta, muitas destas flavonas terão de ser submetidas a mais análises de modo a determinar a sua seletividade, pois é possível que a seletividade diminua com o aumento da atividade antibacteriana. Deste modo, estudos da ação antibacteriana destes compostos deverão ser acompanhados pela análise da sua citotoxicidade em estudos futuros.

## **2. Compostos $\beta$ -lactâmicos**

O anel  $\beta$ -lactama (Figura 11) é o elemento caracterizante da maior família de agentes antibacterianos, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A esta família pertencem fármacos como a penicilina (e seus derivados), cefalosporinas, monobactams e carbapenems [111]. Estes fármacos tendem a ter uma ação bactericida lenta, uma boa distribuição no corpo e baixa toxicidade [112].

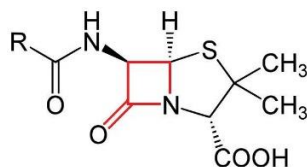


Figura 11 – Anel  $\beta$ -lactâmico (a vermelho) de uma molécula de penicilina. R é o grupo variável.

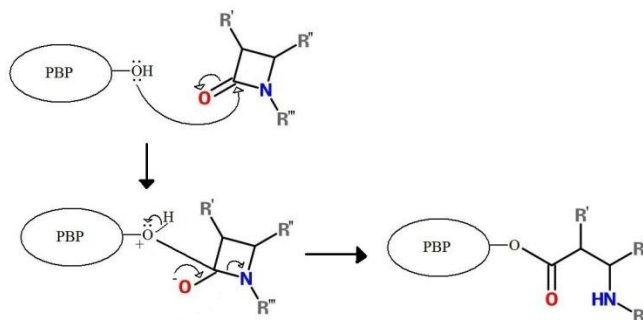
Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos atuam ao se ligarem às PBPs (proteínas que especificamente se ligam às penicilinas) e inibirem o *crosslinking* final nas cadeias laterais peptídicas do peptidoglicano que se forma na parede celular bacteriana [113]. Para tal, estes compostos inibem a transpeptidase bacteriana (uma PBP) através da acilação de um resíduo de serina presente no centro ativo da enzima [114] (Esquema 1). Isto acontece



devido à semelhança estereoquímica entre o anel  $\beta$ -lactâmico e o substrato da transpeptidase, dois resíduos de D-alanina (D-alanina-D-alanina). Uma vez que, quando inibida, a transpeptidase não consegue criar *crosslinks* entre o penúltimo resíduo de alanina de uma cadeia de peptidoglicano e um resíduo de aminoácido de outra cadeia de peptidoglicano, a parede celular da bactéria torna-se frágil e suscetível à lise e à morte celular [114]. Para além disto, a acumulação de precursores de peptidoglicano na célula ativa as hidrolases celulares e autolisinas, o que aumenta a degradação da parede celular, aumentando também a sua fragilidade [115].

No entanto, as bactérias podem desenvolver diferentes tipos de resistência a este grupo de antibióticos, o que diminui consideravelmente a sua atividade. Estes mecanismos resultam de mutações genéticas que permitem às bactérias degradar o antibiótico ou alterar as enzimas alvo do antibiótico ou evitar a permanência do antibiótico na bactéria.

O mecanismo mais comum de resistência é a produção de enzimas que degradem ou modifiquem o antibiótico administrado antes que ele possa atuar sobre a bactéria. As  $\beta$ -lactamases fazem precisamente isso, estas enzimas ligam-se ao anel  $\beta$ -lactâmico e hidrolisam a ligação amida, destruindo o composto. Este tipo de enzimas conta já com mais de 470  $\beta$ -lactamases organizadas geralmente em quatro classes (A-D) [116].



Esquema 1 - Mecanismo da acilação da PBP pelo anel  $\beta$ -lactâmico

As enzimas das classes A, C e D atuam de forma semelhante, através de um ataque nucleofílico de uma serina da enzima ao grupo carbonilo do anel [117]. As enzimas da classe B, por outro lado, apenas conseguem hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico na presença de zinco [118]. Uma forma de assegurar a atividade dos fármacos  $\beta$ -lactâmicos, é administrá-los juntamente com um inibidor de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico [117].

Outro mecanismo de resistência é a alteração das enzimas alvo, de modo a que a interação entre o fármaco e a enzima seja reduzida ou até mesmo inexistente. Para que tal aconteça, as PBPs podem sofrer uma mutação que cause uma diminuição da sua interação com o antibiótico. Estas podem ainda ser substituídas por novas enzimas que sejam menos sensíveis a esta família de antibióticos. A alteração da PBP2x na estirpe *Streptococcus pneumoniae* resistente à penicilina é um exemplo de uma mutação que conferiu resistência à bactéria [119]. O aumento da expressão das PBPs pode também resultar na resistência a este tipo de fármacos, se bem que este mecanismo é o menos eficaz dos três [114].

Por fim, as bactérias podem também expulsar fármacos do seu meio intracelular através de bombas de efluxo. Este mecanismo é mais comum nas bactérias Gram-negativas, sendo uma das maiores contribuições para a resistência a antibióticos por parte destas bactérias. Um exemplo deste caso é o sistema de efluxo de fármacos MexAB-OprM

da *Pseudomonas aeruginosa* [120]. Esta bomba atua em vários fármacos, incluindo fármacos  $\beta$ -lactâmicos e inibidores de  $\beta$ -lactamases, representando assim um alvo adequado para o desenvolvimento de novos antibióticos.

### 3. Flavonas conjugadas com anéis $\beta$ -lactâmicos

Apesar de existirem poucos dados na literatura que identifiquem as flavonas como inibidores dos mecanismos de resistência de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, existem vários exemplos de flavonas que demonstraram atividade antibacteriana contra estirpes de bactérias multirresistentes, atividade sinérgica, ao aumentar o efeito antibacteriano de outros antibióticos, e atividade redutora da patogenicidade bacteriana. Deste modo, concluímos que será relevante tentar aliar estes possíveis efeitos à capacidade de um anel  $\beta$ -lactâmico de inibir PBPs. Assim, idealizou-se a síntese de flavonas contendo anéis  $\beta$ -lactâmicos (Figura 12) e a avaliação da sua atividade antibacteriana, não só com o objetivo de verificar esta atividade, mas também de verificar a variação da suposta atividade com a posição em que é colocado o anel substituinte.

A avaliação da atividade antibacteriana foi implementada no DQ, pelo que testámos mais do que um método e otimizámos condições. A escolha deste tipo de flavonas também se prendeu com o facto de as estruturas base propostas não apresentarem violações à regra de Lipinski (Tabela 1).

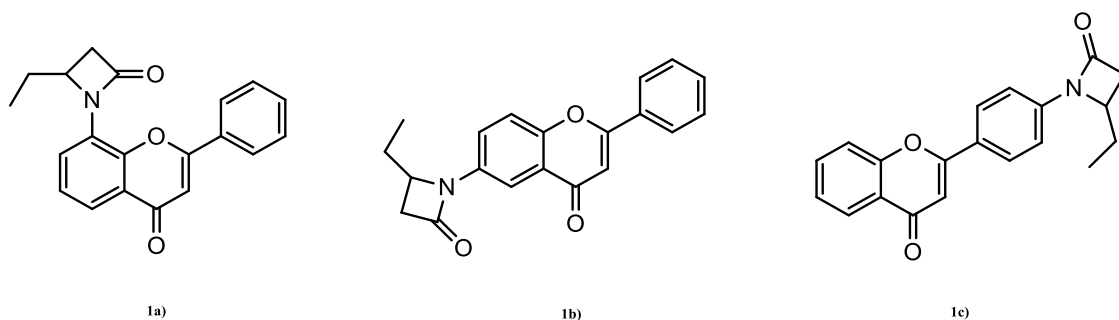


Figura 12 – Flavonas a sintetizar

Apesar da regra de Lipinsky descrever propriedades moleculares importantes para a farmacocinética do composto no corpo humano, como a absorção, distribuição, metabolismo e excreção, esta não está relacionada com o facto de o composto ser, ou não, biologicamente ativo. Esta regra apresenta também algumas limitações. Uma vez que a ‘regra de 5’ é baseada numa distribuição de propriedades calculadas entre vários milhares de fármacos, por definição, alguns fármacos escapam a esta regra. Estes fármacos pertencem a quatro classes de medicamentos oralmente ativos: antibióticos, antifúngicos, vitaminas e cardioglicosídeos. Lipinsky, *et al.* tentaram justificar estas exceções, sugerindo que as classes de medicamentos que escapam à regra são classes cujas estruturas lhes permitem atuar como substrato para transportadores que ocorrem naturalmente [121].

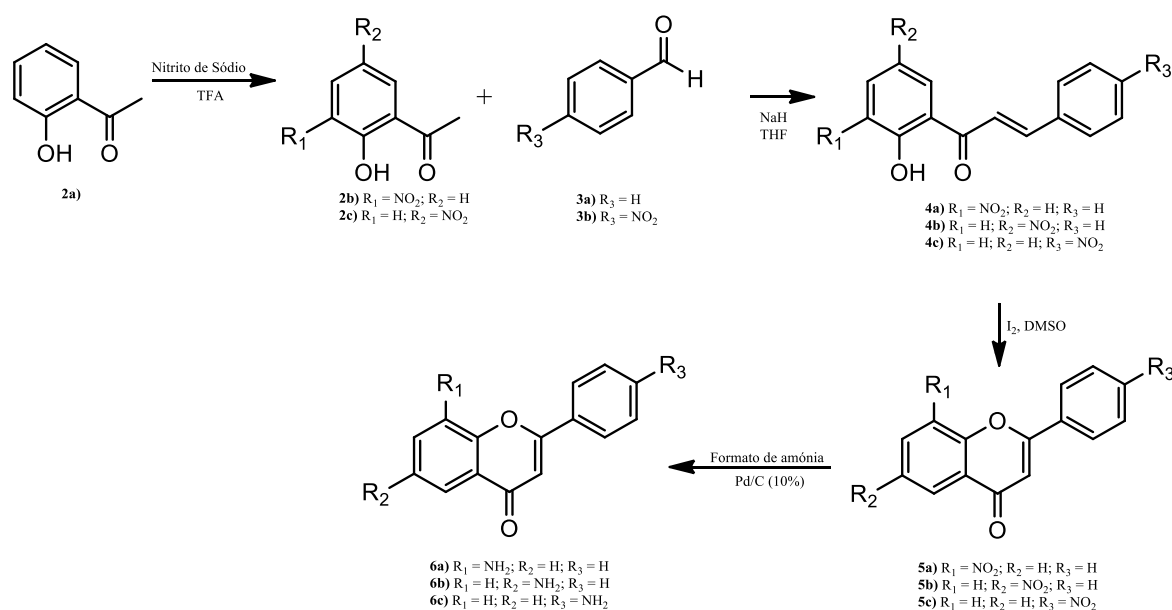
**Tabela 1 – Propriedades importantes calculadas para as estruturas bases 1a, 1b e 1c [121]**

Composto	Mr	miLogP	<i>n</i> -ROTB	<i>n</i> -ON aceitadores	<i>n</i> -OHNH dadores	<i>n</i> -violações	TPSA
1a	319,36	4,11	3	4	0	0	50,52
1b	319,36	4,13	3	4	0	0	50,52
1c	319,36	4,16	3	4	0	0	50,52

Log *P* – coeficiente de partição octanol-água; *n*-ROTB – número de ligações que podem rodar; *n*-ON- número de aceitadores de hidrogénio; *n*-OHNH- número possível de ligações de hidrogénio; *n*-violações- número de violações da regra; TPSA- área de superfície polar (Å)

## 4. Objetivos

Os objetivos deste trabalho consideram a síntese de três flavonas contendo um anel β-lactâmico, no anel B (**1c**) e no anel A (**1a e 1b**) (Figura 12). Estas serão sujeitas a estudos de atividade antibacteriana, cujos resultados possibilitarão a escolha do local ideal do anel β-lactâmico e, deste modo, programar a síntese de outros derivados. A rota sintética idealizada implica a síntese e caracterização de vários intermediários, nomeadamente 2'-hidroxinitrocalconas **4**, nitroflavonas **5** e aminoflavonas **6** (Esquema 2).

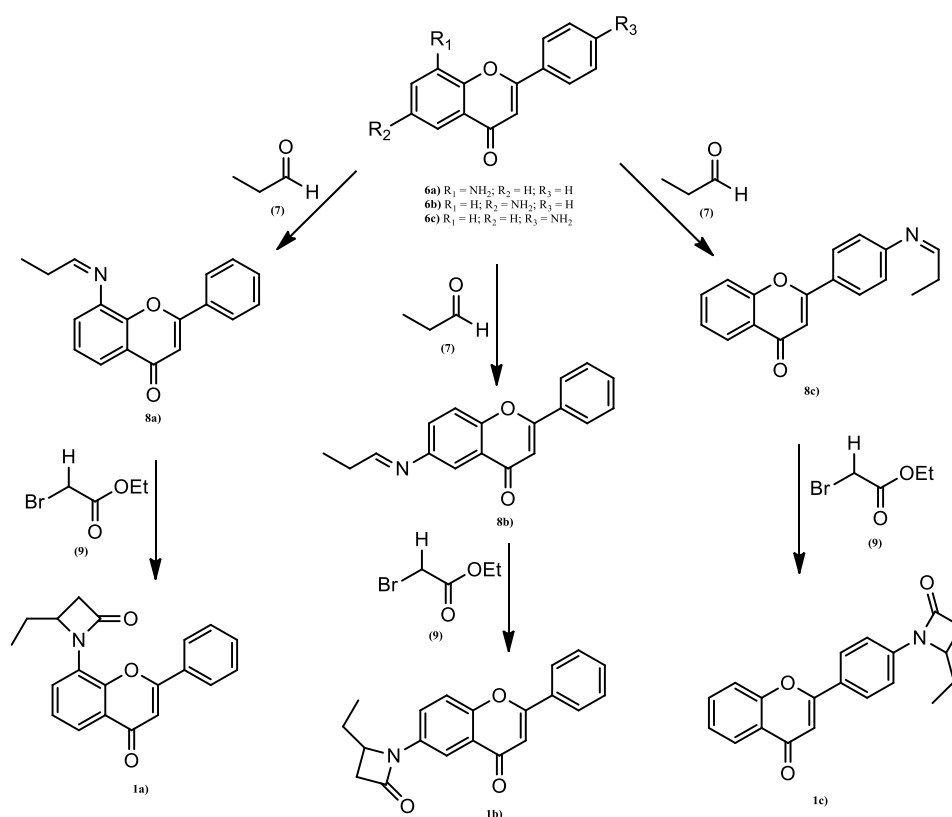


**Esquema 2 – Rota sintética para as flavonas aminadas**

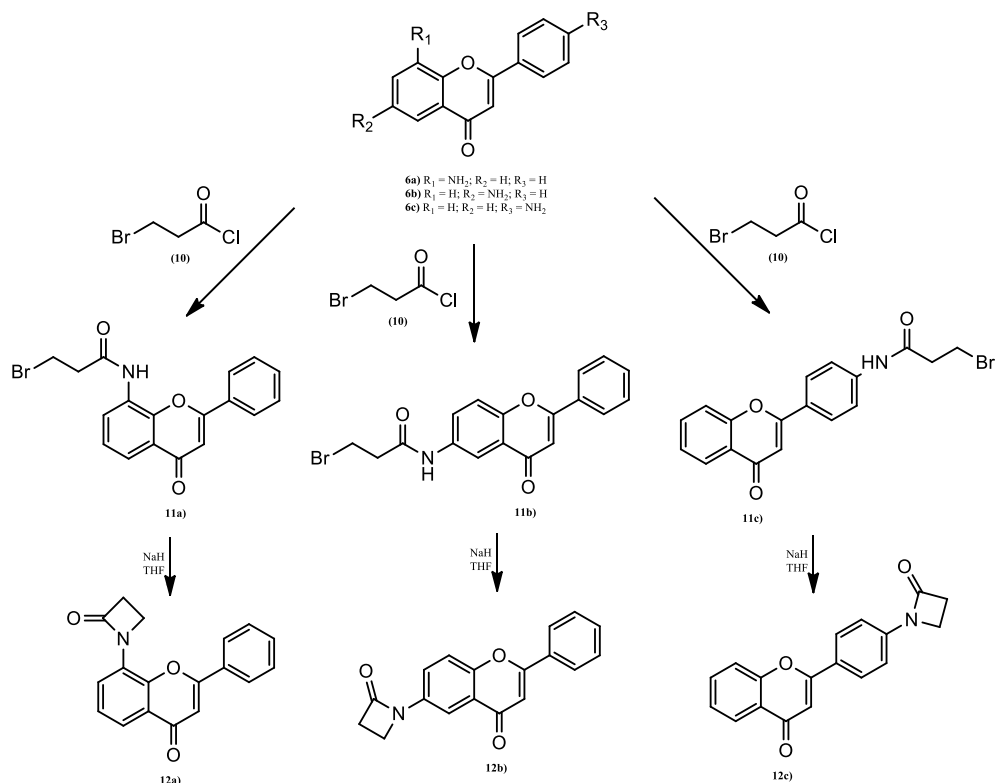
A rota sintética apresentada no Esquema 2 propõe a obtenção das 2'-hidroxinitrocalconas **4** através de uma reação de condensação aldólica [122–124], seguida de uma ciclodesidrogenação [123] da qual resultarão as nitroflavonas **5**. Finalmente, as aminoflavonas **6** serão obtidas através de uma redução do grupo nitro das nitroflavonas **5** [125].

Na tentativa de adicionar um anel  $\beta$ -lactâmico às aminoflavonas, tentaremos recorrer a uma reação de Reformatsky; um tipo de reação que resulta da inserção metálica a ligações halogênio-carbono ativadas por grupos carbonilo (ou grupos derivados ou relacionados com grupos carbonilo) em posições vicinais ou vinílogas e subsequente adição a todo o tipo de eletrófilos [126]. Na literatura, esta reação foi usada previamente para sintetizar este tipo de anéis com sucesso [127,128]. Desta forma, elaboraram-se as rotas sintéticas descritas nos Esquemas 3 e 4.

No Esquema 3, usar-se-á o protocolo seguido por James *et al.* [127]. Para tal, será necessário sintetizar a imina **8** de modo a que esta possa então reagir com o bromoacetato de etilo **9** para formar o anel  $\beta$ -lactâmico **1**. Por outro lado, no Esquema 4 está representada uma rota sintética alternativa, adaptada da rota descrita anteriormente de modo a que não seja necessária a síntese da imina pouco estável, facilitando o processo sintético.

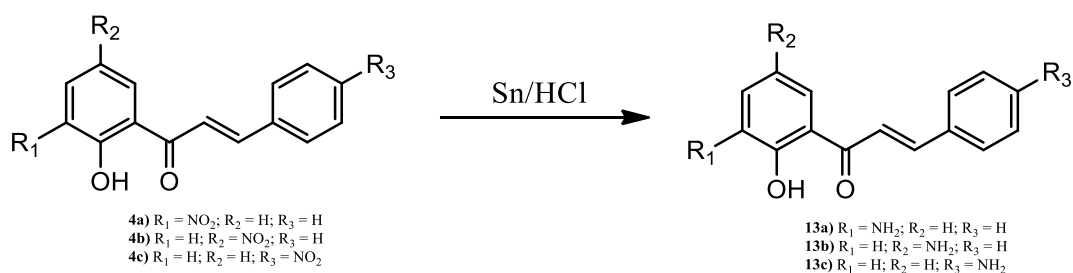


Esquema 3 – Rota sintética para a ligação do anel  $\beta$ -lactâmico à flavona através de uma reação de Reformatsky



**Esquema 4 - Rota sintética para a ligação do anel β-lactâmico à flavona adaptada de uma reação de Reformatsky**

Pretende-se também testar a atividade antibacteriana de alguns intermediários, como as 2'-hidroxinitroalconas **4**, nitroflavonas **5** e aminoflavonas **6**, de modo a comparar as atividades dos compostos nitrados com os aminados. Para isso, será necessária a síntese de 2'-hidroxialconas aminadas. Desta forma, pretendemos aplicar um método que já deu provas de conseguir reduzir grupos nitro em nitroalconas sem as transformar em di-hidroalconas [124] (Esquema 5).



**Esquema 5 – Redução de 2'-hidroxinitroalconas**

## **Material e Métodos**



## 1. Materiais

### Reagentes e Solventes

- Comerciais ou destilados, considerados puros.
- THF comercial foi tratado com sódio metálico e benzofenona e destilado de seguida, de modo a ser considerado “seco”, seguindo um protocolo descrito na literatura [129].

### Sílicas

- Sílica gel para cromatografia em coluna, ultra pura, 40-60  $\mu\text{m}$ , 60A, Acrös Organics
- Sílica gel para cromatografia, 0,060-0,200 mm, 60A, Acrös Organics
- TLC sílica gel, 60 F<sub>254</sub>, Merck
- Celite® Sigma-Aldrich

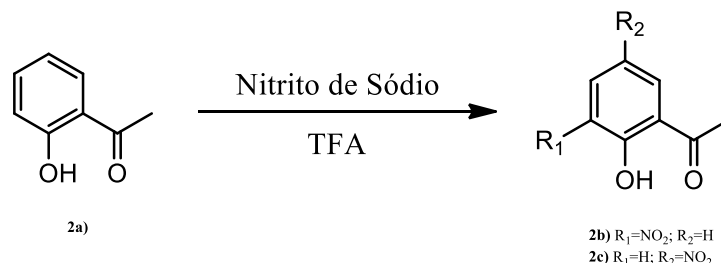
### Equipamentos

- Placas de tlc observadas numa lâmpada UV, a comprimento de onda 254 e/ou 366 nm.
- Os espectros de RMN foram registados em espectrómetros de RMN Bruker Avance de 300 ou 500 MHz [300,13 MHz (1H), 75,47 MHz (13C) ou a 500,13 MHz (1H), 125,77 MHz (13C)] usando TMS como padrão interno.
- Micro-ondas Ethos MicroSynth Labstation (Milestone Inc.)



## 2. Métodos de síntese

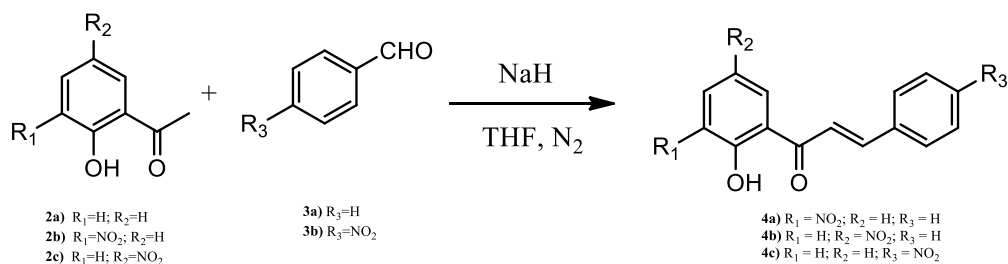
### 1.1. Síntese de 2'-hidroxinitroacetofenonas 2a-b



Esquema 6 - Síntese de nitroacetofenonas 2a-b

Num balão, foram dissolvidos 2 mL de 2'-hidroxiacetofenona (**2a**) em 8 mL de TFA. A esta solução, arrefecida num banho de gelo e sob agitação, foram adicionados 2,3 g de nitrito de sódio. Retirou-se do banho de gelo e deixou-se sob agitação durante 15 minutos. A mistura reacional foi transferida para um copo com gelo e a solução foi neutralizada (pH 6-8) com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH). Após três extrações líquido/líquido com 30 mL diclorometano, concentração da fase orgânica e purificação através de cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de diclorometano/hexano (4:1) como eluente, obtiveram-se dois compostos, **2b** (16%) e **2c** (53%).

### 1.2. Síntese de 2'-hidroxinitrocalconas 4a-c



Esquema 7 - Síntese de nitrocalconas 4a-c

### 2'-Hidroxinitrocalconas 4a e 4b

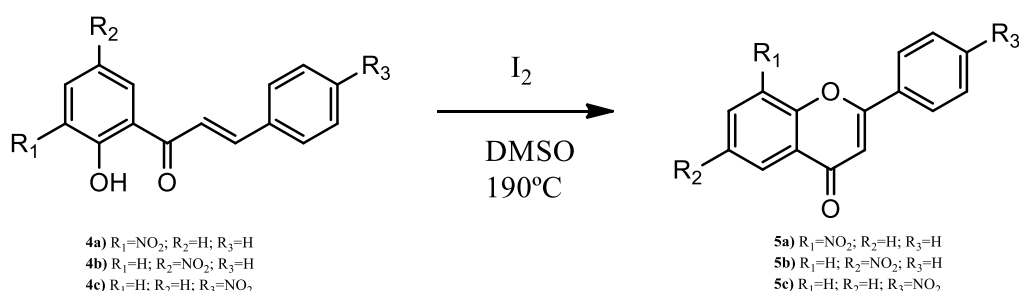
Num reator, foram dissolvidas 100 mg de 2'-hidroxinitroacetofenona (**2b** ou **2c**) em 15 mL de THF. A esta solução, arrefecida num banho de gelo e sob agitação, foram adicionadas 40 mg de hidreto de sódio. Retirou-se do gelo e, depois de adicionados 0,1 mL de benzaldeído (**3a**), o reator foi colocado no aparelho de micro-ondas, sob atmosfera de nitrogénio. A reação durou 30 minutos, à potência de 50 W. A mistura reacional foi transferida para um copo com gelo e a solução foi acidificada (pH 4-5) com uma solução de HCl. O precipitado formado foi filtrado, dissolvido em diclorometano e a solução passada por sulfato de sódio anidro. A purificação foi realizada por cromatografia em

coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de diclorometano/hexano (4:1) como eluente. Os compostos obtidos, **4a** (13%) e **4b** (43%), foram caracterizados por RMN.

### 2'-Hidroxinitroalcona **4c**

Num reator, foram dissolvidas 100 mg de 2'-hidroxiacetofenona (**2a**) em 15 mL de THF. A esta solução, arrefecida num banho de gelo e sob agitação, foram adicionadas 40 mg de hidreto de sódio. Retirou-se do gelo e, depois de adicionados 0,1 mL de 4-nitrobenzaldeído (**3b**), o reator foi colocado a agitar, sob atmosfera de azoto e protegido da luz, durante 2 horas. A mistura reacional foi transferida para um copo com gelo e a solução foi acidificada (pH 4-5) com uma solução de 1:2 de H<sub>2</sub>O/HCl (36%). O precipitado formado foi filtrado, dissolvido em diclorometano e a solução passada por sulfato de sódio anidro. A purificação foi realizada por cromatografia em coluna de sílica gel, utilizando uma mistura de diclorometano/hexano (4:1) como eluente. O composto obtido **4c** (67%) foi caracterizado por RMN.

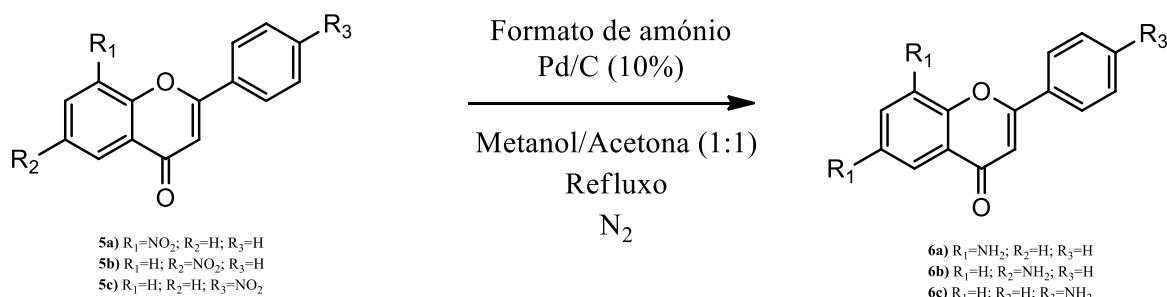
### 1.3. Síntese de nitroflavonas **5a-c**



Esquema 8 - Síntese de nitroflavonas **5a-c**

Num balão, foram dissolvidas 100 mg da 2'-hidroxicalcona apropriada (**4a**, **4b** e **4c**) em 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). À solução foram adicionadas 4,7 mg de iodo e colocou-se a mistura reacional num banho de areia a 195°C, de modo a que o DMSO refluxe. Após 30 minutos, a mistura reacional foi transferida para um copo com gelo e tiosulfato de sódio, para tratar o excesso de iodo. O precipitado foi filtrado, dissolvido em diclorometano e a solução passada por sulfato de sódio anidro, de modo a retirar vestígios de água. A purificação foi realizada recorrendo à cromatografia em coluna de sílica gel e/ou cromatografia em placa fina utilizando diclorometano como eluente. Os compostos obtidos, **5a** (77%), **5b** (65%) e **5c** (57%), foram caracterizados por RMN.

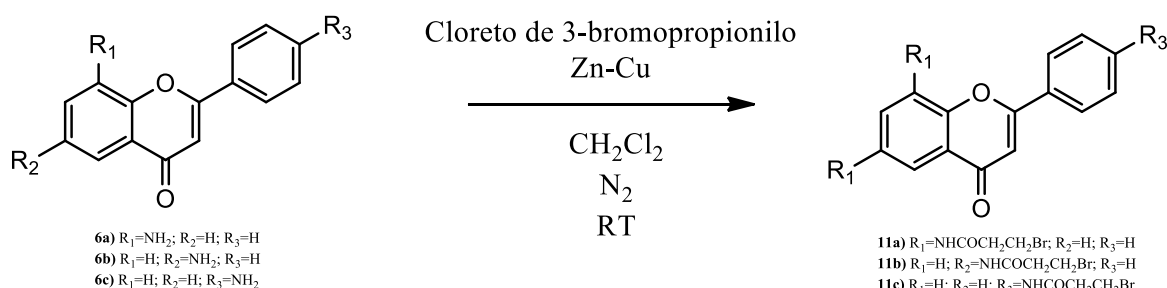
### 1.4. Síntese de aminoflavonas 6a-c



Esquema 9 - Síntese de aminoflavonas 6a-c

Num balão de fundo redondo, foram dissolvidas 76 mg de Pd/C e 408 mg de formato de amônio em 6 mL de metanol/acetona (1:1). O balão foi colocado, sob atmosfera de nitrogênio, a agitar num banho de óleo e aquecido até a solução começar a refluxar. De seguida, foram adicionadas 102 mg da nitroflavona (**5a**, **5b** ou **5c**). Ao fim de 2 horas, a mistura foi filtrada num funil de placa porosa com celite, de modo a retirar o Pd/C, evaporando de seguida a solução obtida. A purificação foi realizada recorrendo à cromatografia em coluna de sílica gel utilizando uma mistura de diclorometano/acetato de etilo (4:1) como eluente. Os compostos obtidos, **6a** (95%), **6b** (86%), **6c** (78%), foram caracterizados por RMN.

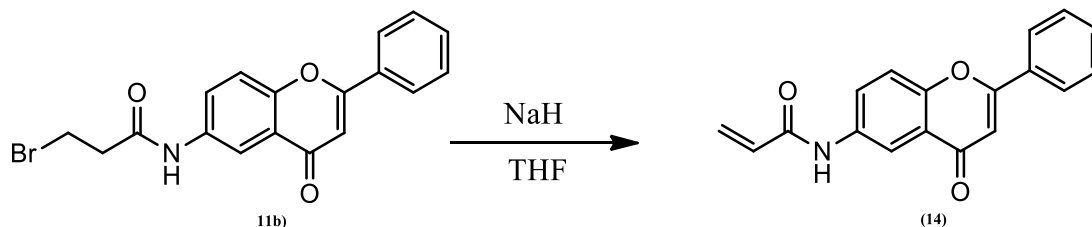
### 1.5. Síntese de amidoflavonas 11a-c



Esquema 10 - Síntese de amidoflavonas 11a-c

Num balão, foram dissolvidos 10 mg de flavona (**6a-c**) em 50 mL de diclorometano. De seguida, foram adicionados 0,1 mL de cloreto de 3-bromopropionilo (**11**) e 54 mg de Zn-Cu em pó (previamente preparado, segundo o protocolo descrito na literatura [130]). A mistura foi colocada a agitar, sob atmosfera de nitrogênio, durante 2 horas. De modo a terminar a reação, a solução foi acidificada com HCl (pH = 5-6) e passada por um funil de placa porosa com celite com metanol, para filtrar o Zn-Cu. Os compostos obtidos, **11a** (47%), **11b** (27%) e **11c** (38%), foram purificados através de cristalização em metanol e a sua caracterização foi feita por RMN.

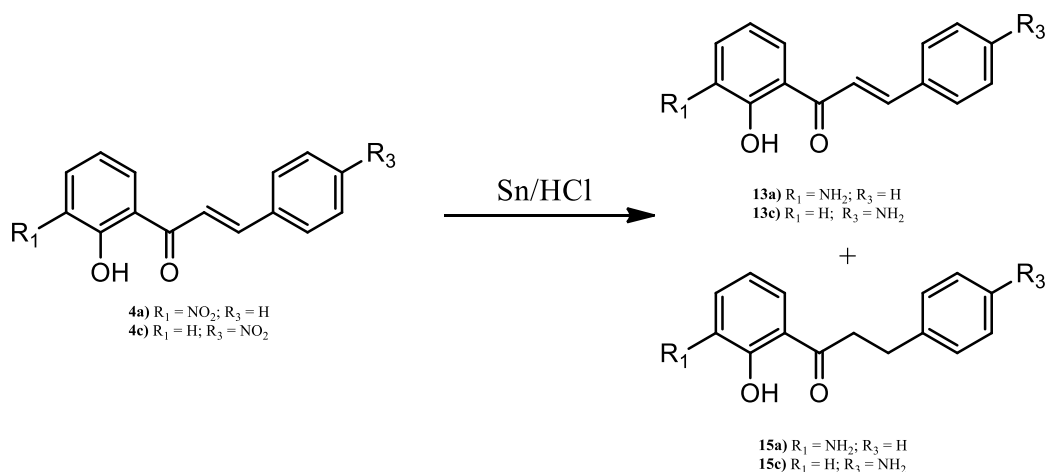
## 1.6. Síntese da 6-acrilamidoflavona 14



Esquema 11 - Síntese da 6-acrilamidoflavona 14

Num balão, foram dissolvidas 14.5 mg de 6-amidoflavona (**11b**) em 15 mL de THF. Depois de colocar o balão a agitar, num banho de gelo, foram adicionadas 10 mg de hidreto de sódio. A mistura reacional foi então deixada a agitar, sob atmosfera de nitrogênio e protegida da luz, durante 24 horas. A reação foi parada transferindo o conteúdo do balão para um copo com gelo e acidificando de seguida a solução a pH 4-5. O composto foi extraído da água através de três extrações líquido-líquido, usando 20 mL de diclorometano como fase orgânica. A solução obtida foi então passada por sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. A purificação foi realizada recorrendo à cromatografia em placa fina, utilizando uma mistura de acetato de etilo-metanol (3:1) como eluente. O composto obtido, **14** (95%), foi caracterizado por RMN.

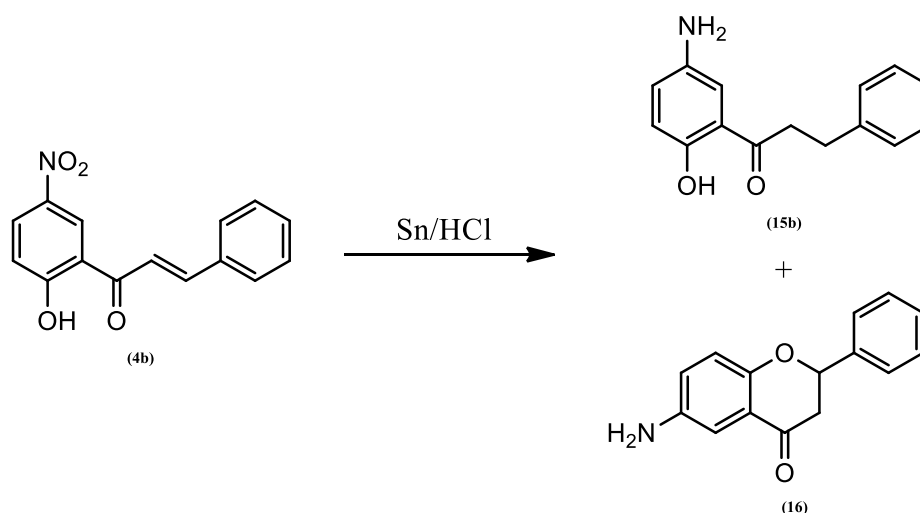
## 1.7. Síntese de 2'-hidroxiaminocalconas 13a e 13c e de 2'-hidroxiaminodi-hidrocalconas 15a e 15c



Esquema 12 - Síntese de aminocalconas 13a e 13c e de amino di-hidrocalconas 15a e 15c

A uma solução de 56 mg de 2'-hidroxinitrocalconas (**4a** e **4c**) em 20 mL de diclorometano foram adicionados, lentamente, 3,5 mL de HCl e 1250 mg de Sn. A reação foi mantida a agitar vigorosamente, a 30°C, durante 24 horas. Esgotado o tempo da reação, o Sn foi filtrado da mistura reacional utilizando um funil de Buchner. Depois de neutralizada a mistura reacional, os compostos obtidos (**13a**, **13c**, **15a** e **15c**) foram extraídos da água através de cinco extrações líquido-líquido com 30 mL de diclorometano como fase orgânica. A solução foi passada por sulfato de sódio anidro e evaporada à securo. Os compostos **13a** (24%), **13c** (18%), **15a** (9%) e **15c** (8%) foram purificados através de cromatografia em placa fina, utilizando uma mistura de diclorometano/hexano (8:2) como eluente, sendo depois caracterizados por RMN.

### 1.8. Síntese da 6-aminoflavanona **16** e da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15a**



Esquema 13 - Síntese da 6-aminoflavanona **16** e da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15b**

A uma solução de 56 mg de 2'-hidroxi-5'-nitrocalcona **4b** em 20 mL de diclorometano foram adicionados, lentamente, 3,5 mL de HCl e 1250 mg de estanho. A reação foi mantida a agitar vigorosamente, a 30°C, durante 24 horas. Esgotado o tempo da reação, o estanho foi filtrado e a mistura reacional neutralizada. Os compostos obtidos (**15b** e **16**) foram extraídos da água através de cinco extrações líquido-líquido com 30 mL de diclorometano como fase orgânica. A solução foi passada por sulfato de sódio anidro e evaporada à securo. Os compostos **15b** (7%) e **16** (10%) foram purificados através de cromatografia em placa fina, utilizando uma mistura de diclorometano/hexano (8:2) como eluente, sendo depois caracterizados por RMN.

### 3. Atividade Antibacteriana

#### 1.1. Método de diluição no agar

O método usado para testar a atividade antibacteriana foi o método de diluição em agar, uma técnica bem estabelecida [131]. Seguindo este método, o composto a testar é incorporado no agar, variando a sua concentração de placa para placa. O agente inoculador é depois aplicado à superfície e deixado a incubar durante um determinado período de tempo, após o qual se verifica se o composto demonstra, ou não, atividade antibacteriana naquela concentração.

##### 1.1.1. Materiais

- Agar Mueller-Hington;
- Placas de Petri;
- Suspensão de *Escherichia coli* (0,5 McFarland, aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU/mL);
- Suspensão de *Listeria* (0,5 McFarland, aproximadamente  $1 \times 10^8$  CFU/mL);
- Micropipetas;
- Soluções de compostos a testar, dissolvidos em DMSO (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 128  $\mu\text{g/mL}$ )

##### 1.1.2. Procedimento

###### Preparação das placas

1. Adicionar as diferentes soluções a diferentes soluções de agar derretido, a aproximadamente 45-50°C.
2. Misturar bem e verter para as respectivas placas de Petri até que o agar atinja uma altura de cerca de 3-4 mm. Este passo deve ser feito logo a seguir ao primeiro passo de modo a evitar que ocorra uma solidificação parcial. Ter atenção para não criar bolhas no agar.
3. Deixar as placas arrefecerem, de modo a que o agar solidifique.

###### Preparação do agente inoculante

1. Diluir a suspensão de *Escherichia coli* 1:10 com água estéril.
2. Repetir o primeiro passo duas vezes, de modo a preparar uma suspensão com  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Esta será a suspensão a usar para inocular as placas.

### **Inoculação das placas**

1. Com a micropipeta, aplicar 100 µL de suspensão, pelo menos 3 vezes, em cada placa de Petri. De modo a obter uma concentração final de  $1 \times 10^4$  CFU por aplicação
2. Inocular uma placa controlo sem agente antibacteriano primeiro, seguindo para a inoculação das outras placas, da de menor concentração de agente antibacteriano para a de maior concentração. Inocular uma segunda placa controlo sem agente antibacteriano, para assegurar que não houve contaminação.

### **Incubação das placas**

1. Deixar as placas à temperatura ambiente até a humidade do inóculo seja absorvida pelo agar.
2. Inverter e colocar as placas a incubar, durante 16-20 horas, a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ .

### **Determinação das concentrações inibitórias mínimas (MICs)**

1. Registrar as MICs como a concentração mais baixa de agente antimicrobiano que conseguiu inibir completamente o crescimento bacteriano.

## **Resultados**

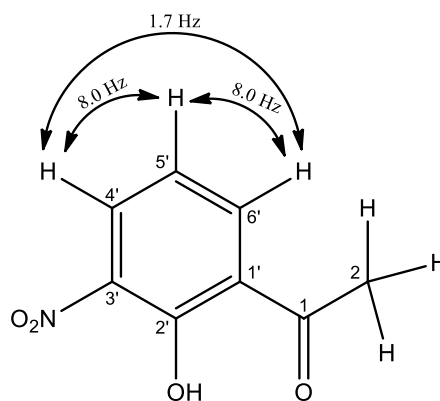




## 1. Caracterização dos compostos sintetizados

### 1.1. 2'-Hidroxinitroacetofenonas

#### 2'-Hidroxi-3'-nitroacetofenona (2b)



2'-Hidroxi-3'-nitroacetofenona (2b)

Figura 13 – Estrutura e constantes de acoplamento da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona (2b)

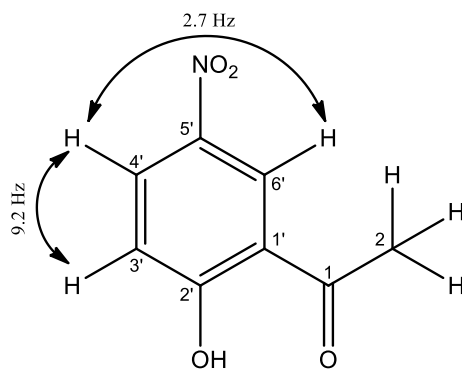
Tabela 2 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona 2b

Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
H-2	s	2,71	
O-H	s	13,18	
H-4'	dd	8,14	1,7/8,0
H-5'	t	7,03	8,0
H-6'	dd	8,05	1,7/8,0

Tabela 3 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona 2b

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-1'	123,0	C-6'	136,5
C-2'	156,2	C-1	203,5
C-3'	137,9	C-2	27,9
C-4'	131,7		
C-5'	118,5		

## 2'-Hidroxi-5'-nitroacetofenona (2c)



2'-Hidroxi-5'-nitroacetofenona (2c)

Figura 14 – Estrutura e constantes de acoplamento da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona (2c)

Tabela 4 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona 2c

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
H-2	s	2,76	
O-H	s	12,88	
H-3'	d	7,10	9,2
H-4'	dd	8,36	2,7/9,2
H-6'	d	8,72	2,7

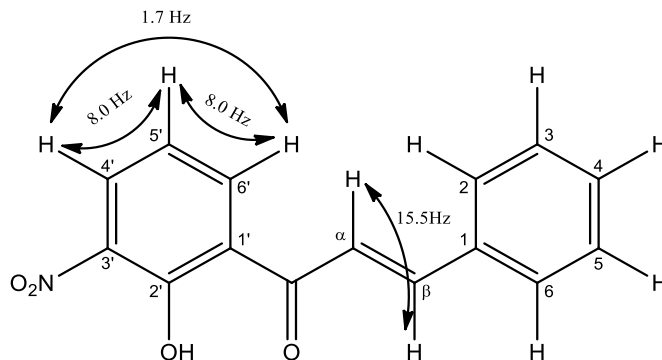
Tabela 5 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona 2c

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-1'	118,5	C-6'	127,2
C-2'	167,2	C-1	204,0
C-3'	119,6	C-2	26,8
C-4'	131,1		
C-5'	139,5		

## 1.2. (E)-2'-Hidroxicalconas

### (E)-2'-Hidroxi-3'-nitrocalcona (4a)

EM ESI m/z (int. rel.): 270 ([M+H]<sup>+</sup>, 84); 292 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100); 308 ([M+K]<sup>+</sup>, 10)



(E)-2'-Hidroxi-3'-nitrocalcona (4a)

Figura 15 – Estrutura e constantes de acoplamento da (E)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona (4a)

Tabela 6 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da (E)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona 4a

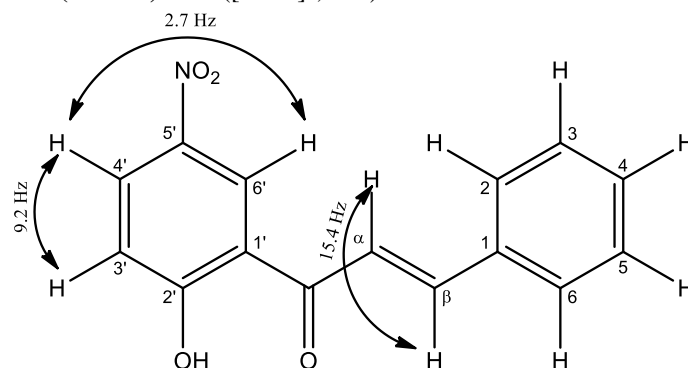
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
O-H	s	13,44	
H-4'	dd	8,23	1,7/8,0
H-5'	t	7,08	8,0
H-6'	dd	8,18	1,7/8,0
H-α	d	7,59	15,6
H-β	d	7,95	15,6
H-2,6	m	7,66-7,69	
H-3,5	m	7,41-7,49	
H-4	m	7,41-7,49	

Tabela 7 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da (E)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona 4a

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C=O	192,4	C-5'	118,4
C-α	120,8	C-6'	135,8
C-β	147,2	C-1	134,2
C-1'	125,4	C-2,6	128,9
C-2'	156,7	C-3,5	129,2
C-3'	124,6	C-4	131,5
C-4'	131,1		

## (*E*)-2'-Hidroxi-5'-nitroalcona (4b)

EM ESI m/z (int. rel.): 270 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)



(*E*)-2'-Hidroxi-5'-nitroalcona (4b)

Figura 16 – Estrutura e constantes de acoplamento da (*E*)-2'-hidroxi-5'-nitroalcona (4b)

Tabela 8 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da (*E*)-2'-hidroxi-5'-nitroalcona 4b

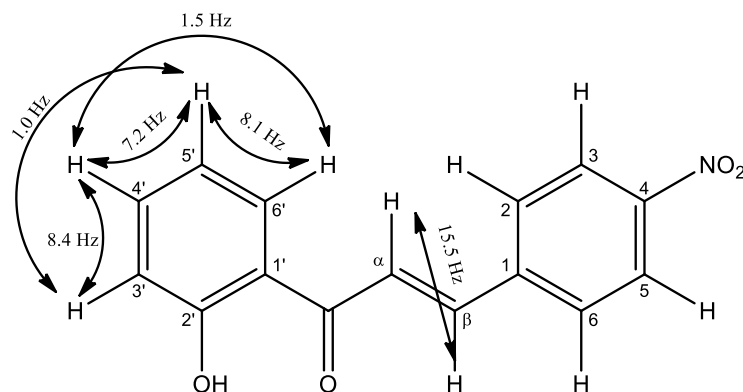
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
O-H	s	13,58	
H-3'	d	7,14	9,2
H-4'	dd	8,39	2,7/9,2
H-6'	d	8,91	2,7
H-α	d	7,69	15,4
H-β	d	8,06	15,4
H-2,6	m	7,73-7,76	
H-3,5	m	7,49-7,51	
H-4	m	7,49-7,51	

Tabela 9 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da (*E*)-2'-hidroxi-5'-nitroalcona 4b

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C=O	192,9	C-1	133,9
C-α	118,4	C-2,6	129,2
C-β	148,2	C-3,5	129,2
C-1'	119,7	C-4	131,8
C-2'	168,5		
C-3'	119,7		
C-4'	130,9		
C-5'	138,8		
C-6'	126,1		

## (*E*)-2'-Hidroxi-4-nitrocalcona (4c)

EM ESI m/z (int. rel.): 270 ([M+H]<sup>+</sup>, 100)



(*E*)-2'-Hidroxi-4-nitrocalcona (4c)

Figura 17 – Estrutura e constantes de acoplamento da (*E*)-2'-hidroxi-4-nitrocalcona (4c)

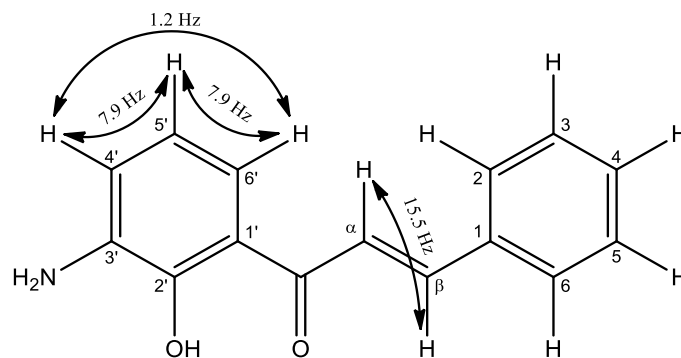
Tabela 10 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da (*E*)-2'-hidroxi-4-nitrocalcona 4c

Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
O-H	s	12,59	
H-3'	dd	7,06	1,0/8,4
H-4'	ddd	7,55	1,5/7,2/8,4
H-5'	ddd	6,98	1,0/7,2/8,1
H-6'	dd	7,92	1,5/8,1
H-α	d	7,76	15,5
H-β	d	7,93	15,5
H-2,6	m	8,30	
H-3,5	m	7,82	

Tabela 11 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da (*E*)-2'-hidroxi-4-nitrocalcona 4c

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C=O	193,0	C-1	140,7
C-α	124,1	C-2,6	129,1
C-β	142,1	C-3,5	124,3
C-1'	119,8	C-4	148,7
C-2'	163,8		
C-3'	118,9		
C-4'	137,1		
C-5'	119,1		
C-6'	129,7		

**(E)-3'-Amino-2'-hidroxicalcona (13a)**



**(E)-3'-Amino-2'-hidroxicalcona (13a)**

**Figura 18 – Estrutura e constantes de acoplamento da (E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona (13a)**

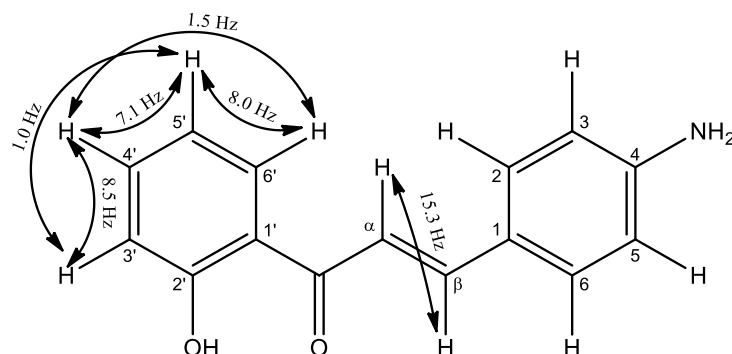
**Tabela 12 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da (E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona 13a**

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	3,96	
O-H	s	13,06	
H-4'	dd	6,93	1,2/7,9
H-5'	t	6,79	7,9
H-6'	dd	7,35	1,2/7,9
H- $\alpha$	d	7,66	15,5
H- $\beta$	d	7,92	15,5
H-2,6	m	7,65-7,67	
H-3,5	m	7,43-7,45	
H-4	m	7,43-7,45	

**Tabela 13 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da (E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona 13a**

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C=O	194,2	C-5'	110,7
C- $\alpha$	120,5	C-6'	118,7
C- $\beta$	145,1	C-1	134,7
C-1'	119,3	C-2,6	128,7
C-2'	151,6	C-3,5	129,0
C-3'	136,6	C-4	130,8
C-4'	120,1		

**(E)-4-Amino-2'-hidroxicalcona (13c)**



**(E)-4-Amino-2'-hidroxicalcona (13c)**

**Figura 19 – Estrutura e constantes de acoplamento da (E)-4-amino-2'-hidroxicalcona (13c)**

**Tabela 14 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da (E)-4-amino-2'-hidroxicalcona 13c**

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
O-H	s	13,07	
NH <sub>2</sub>	sl	4,06	
H-3'	dd	7,02	1,0/8,5
H-4'	ddd	7,48	1,5/7,1/8,5
H-5'	ddd	6,93	1,0/7,1/8,0
H-6'	dd	7,92	1,5/8,0
H- $\alpha$	d	7,48	15,3
H- $\beta$	d	7,89	15,3
H-2,6	m	7,50-7,54	
H-3,5	m	6,70	

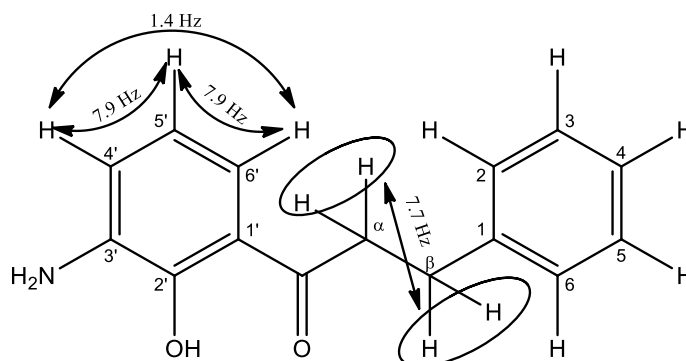
**Tabela 15 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da (E)-4-amino-2'-hidroxicalcona 13c**

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C=O	193,7	C-1	124,9
C- $\alpha$	115,5	C-2,6	130,9
C- $\beta$	146,2	C-3,5	114,9
C-1'	120,3	C-4	149,5
C-2'	163,5		
C-3'	118,5		
C-4'	135,9		
C-5'	118,7		
C-6'	129,4		



### 1.3. 2'-Hidroxi-di-hidrocalconas

#### 3'-Amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15a)



3'-Amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15a)

Figura 20 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3'-amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona (15a)

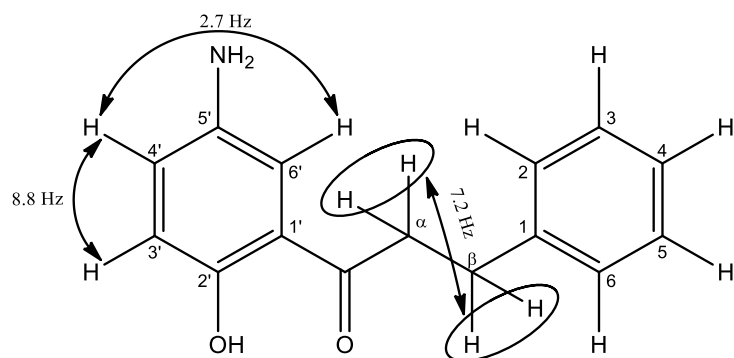
Tabela 16 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 3'-amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona 15a

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	3,96	
O-H	sl	12,51	
H-4'	dd	6,87	1,4/7,9
H-5'	t	6,71	7,9
H-6'	dd	7,17	1,4/7,9
H- $\alpha$	t	3,32	7,7
H- $\beta$	t	3,06	7,7
H-2,6	m	7,29-7,31	
H-3,5	m	7,22-7,24	
H-4	m	7,22-7,24	

Tabela 17 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 3'-amino-2'-hidroxi-di-hidrocalcona 15a

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C=O	206,0	C-5'	118,8
C- $\alpha$	40,2	C-6'	118,7
C- $\beta$	30,1	C-1	140,8
C-1'	118,6	C-2,6	128,9
C-2'	150,5	C-3,5	128,4
C-3'	136,5	C-4	126,3
C-4'	119,9		
C-5'	118,8		
C-6'	118,7		

## 5'-Amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15b)



5'-Amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15b)

Figura 21 – Estrutura e constantes de acoplamento da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15b)

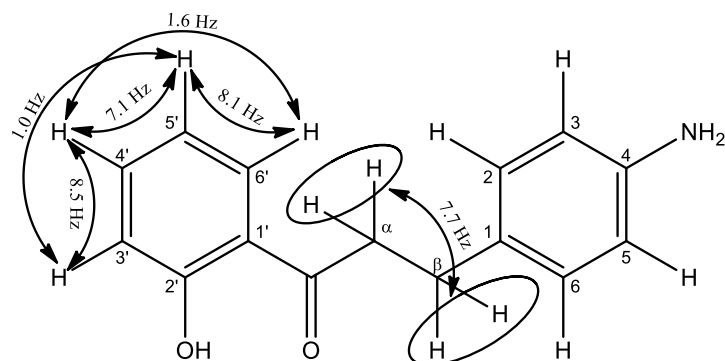
Tabela 18 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15b

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	3,43	
O-H	s	11,76	
H-3'	d	6,84	8,8
H-4'	dd	6,90	2,7/8,8
H-6'	d	7,03	2,7
H- $\alpha$	t	3,27	7,2
H- $\beta$	t	3,05	7,2
H-2,6	m	7,20-7,25	
H-3,5	m	7,29-7,34	
H-4	m	7,20-7,25	

Tabela 19 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15b

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C=O	204,9	C-1	140,8
C- $\alpha$	40,1	C-2,6	128,4
C- $\beta$	30,0	C-3,5	129,6
C-1'	119,0	C-4	126,3
C-2'	155,8		
C-3'	119,2		
C-4'	125,3		
C-5'	138,0		
C-6'	114,4		

## 4-Amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15c)



4-Amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15c)

Figura 22 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona (15c)

Tabela 20 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15c

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
O-H	s	12,34	
H-3'	dd	6,98	1,0/8,5
H-4'	ddd	7,46	1,6/7,1/8,5
H-5'	ddd	6,88	1,0/7,1/8,1
H-6'	dd	7,75	1,6/8,1
H-2/H-6	m	7,04	
H-3/H-5	m	6,64	
H- $\alpha$	t	3,27	7,7
H- $\beta$	t	2,96	7,7

Tabela 21 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona 15c

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-1'	119,3	C-1	130,6
C-2'	162,5	C-2,6	129,2
C-3'	118,5	C-3,5	115,4
C-4'	136,3	C-4	144,7
C-5'	118,9	C=O	205,8
C-6'	129,9	C- $\alpha$	40,5
		C- $\beta$	29,4

## 1.4. Flavanonas

### 6-Aminoflavanona (16)

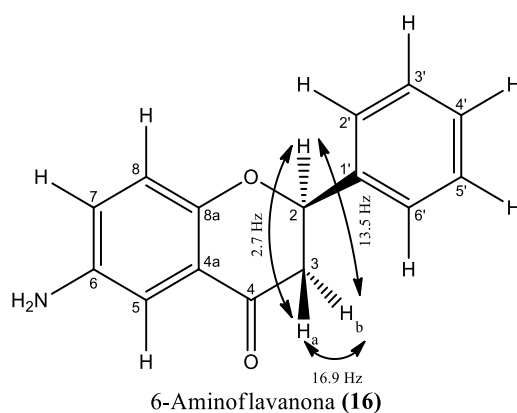


Figura 23 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-aminoflavanona (16)

Tabela 22 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 6-aminoflavanona 16

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
N-H <sub>2</sub>	sl	3,58	
H-2	dd	5,41	2,7/13,5
H-3a	dd	2,85	2,7/16,9
H-3b	dd	3,05	13,5/16,9
H-5	s	7,20	
H-7	s	6,91	
H-8	s	6,91	
H-2',6'	m	7,47-7,49	
H-3',5'	m	7,42-7,45	
H-4'	m	7,36-7,39	

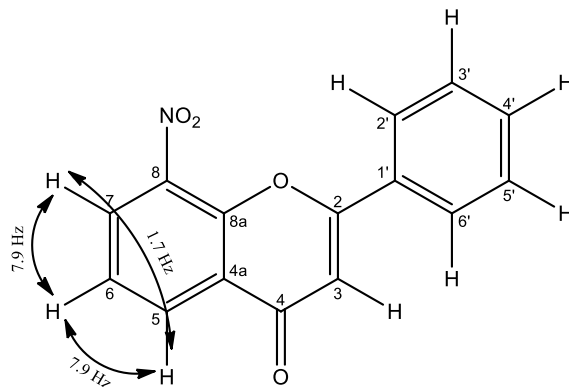
Tabela 23 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 6-aminoflavanona 16

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-2	79,6	C-1'	139,1
C-3	44,9	C-2',6'	126,2
C-4	192,4	C-3',5'	128,8
C-4a	121,1	C-4'	128,7
C-5	110,9		
C-6	140,7		
C-7	124,6		
C-8	118,9		
C-8a	155,0		

## 1.5. Flavonas

### 8-Nitroflavona (5a)

EM ESI m/z (int. rel.): 268 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); 290 ([M+Na]<sup>+</sup>, 99)



8-Nitroflavona (5a)

Figura 24 – Estrutura e constantes de acoplamento da 8-nitroflavona (5a)

Tabela 24 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 8-nitroflavona 5a

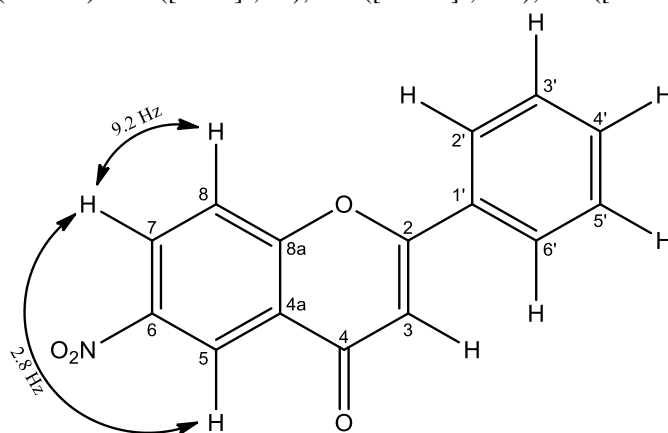
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	s	6,95	
H-5	dd	8,54	1,7/7,9
H-6	m	7,52-7,61	7,9
H-7	dd	8,41	1,7/7,9
H-2',6'	m	8,02-8,05	
H-3',5'	m	7,52-7,61	
H-4'	m	7,52-7,61	

Tabela 25 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 8-nitroflavona 5a

Carbono	Posição (ppm)	Carbono	Posição (ppm)
C-2	163,1	C-8	138,7
C-3	107,5	C-8a	148,7
C-4	176,3	C-1'	130,4
C-4a	125,8	C-2',6'	126,7
C-5	131,9	C-3',5'	129,3
C-6	124,4	C-4'	132,5
C-7	130,1		

## 6-Nitroflavona (5b)

EM ESI m/z (int. rel.): 268 ([M+H]<sup>+</sup>, 86); 290 ([M+Na]<sup>+</sup>, 100); 306 ([M+K]<sup>+</sup>, 3)



6-Nitroflavona (5b)

Figura 25 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-nitroflavona (5b)

Tabela 26 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 6-nitroflavona 5b

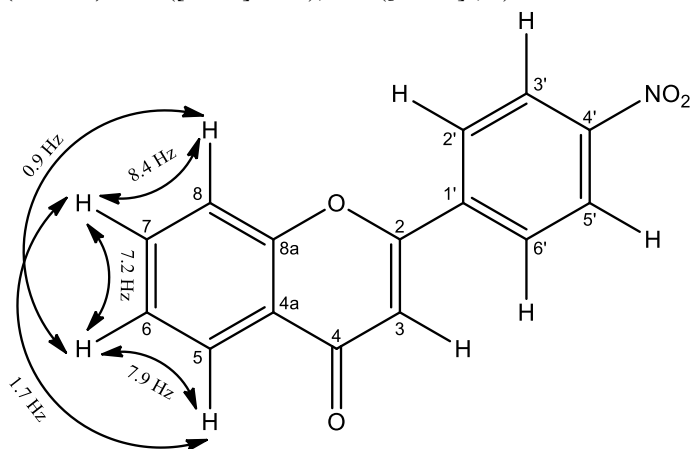
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	s	6,90	
H-5	d	9,12	2,8
H-7	dd	8,55	2,8/9,2
H-8	d	7,74	9,2
H-2',6'	m	7,93-7,96	
H-3',5'	m	7,55-7,62	
H-4'	m	7,55-7,62	

Tabela 27 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 6-nitroflavona 5b

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	164,2	C-8	119,8
C-3	107,9	C-8a	159,1
C-4	176,7	C-1'	130,8
C-4a	124,1	C-2',6'	126,5
C-5	122,5	C-3',5'	129,3
C-6	144,9	C-4'	132,4
C-7	128,2		

## 4'-Nitroflavona (5c)

EM ESI m/z (int. rel.): 268 ([M+H]<sup>+</sup> 100); 290 ([M+Na]<sup>+</sup>, 8)



4'-Nitroflavona (5c)

Figura 26 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4'-nitroflavona (5c)

Tabela 28 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 6-nitroflavona 5c

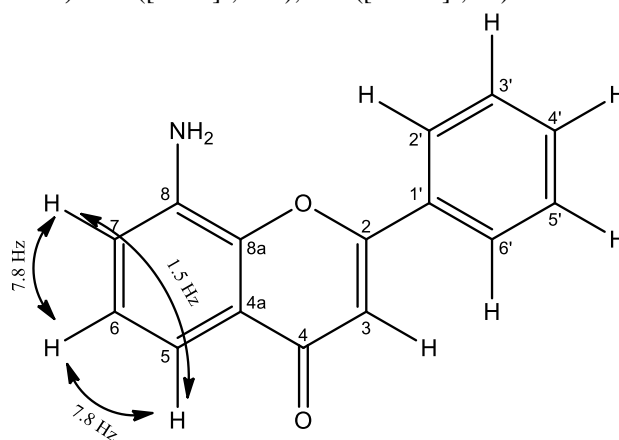
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
H-3	S	6,93	
H-5	dd	8,24	1,7/7,9
H-6	ddd	7,48	0,9/7,2/7,9
H-7	ddd	7,78	1,7/7,2/8,4
H-8	dd	7,23	0,9/8,4
H-2',6'	td	8,15	2,2/9,3
H-3',5'	td	8,40	2,2/9,3

Tabela 29 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 6-nitroflavona 5c

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	160,6	C-8	118,2
C-3	109,5	C-8a	156,1
C-4	177,9	C-1'	137,6
C-4a	123,8	C-2',6'	127,2
C-5	125,7	C-3',5'	124,2
C-6	125,7	C-4'	149,4
C-7	159,1		

## 8-Aminoflavona (6a)

EM ESI m/z (int. rel.): 238 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); 260 ([M+Na]<sup>+</sup>, 95)



8-Aminoflavona (6a)

Figura 27 – Estrutura e constantes de acoplamento da 8-aminoflavona (6a)

Tabela 30 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 8-aminoflavona 6a

Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	4,22	
H-3	sl	6,80	
H-5	dd	7,60	1,5/7,8
H-6	t	7,22	7,8
H-7	dd	7,06	1,5/7,8
H-2',6'	m	7,88-7,91	
H-3',5'	m	7,53-7,57	
H-4'	m	7,53-7,57	

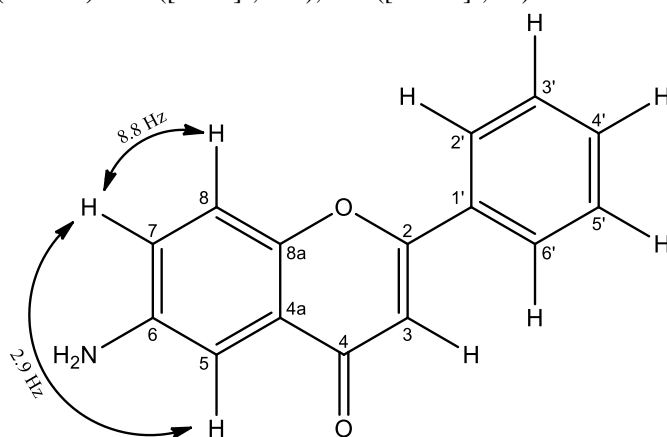
Tabela 31 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 8-aminoflavona 5a

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	162,7	C-8a	145,1
C-3	107,8	C-1'	132,1
C-4	178,9	C-2',6'	126,3
C-4a	124,4	C-3',5'	129,1
C-5	114,4	C-4'	131,6
C-6	125,4		
C-7	118,2		
C-8	136,2		



## 6-Aminoflavona (6b)

EM ESI m/z (int. rel.): 238 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); 260 ([M+Na]<sup>+</sup>, 27)



6-Aminoflavona (6b)

Figura 28 – Estrutura e constantes de acoplamento da 6-aminoflavona (6b)

Tabela 32 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 6-aminoflavona 6b

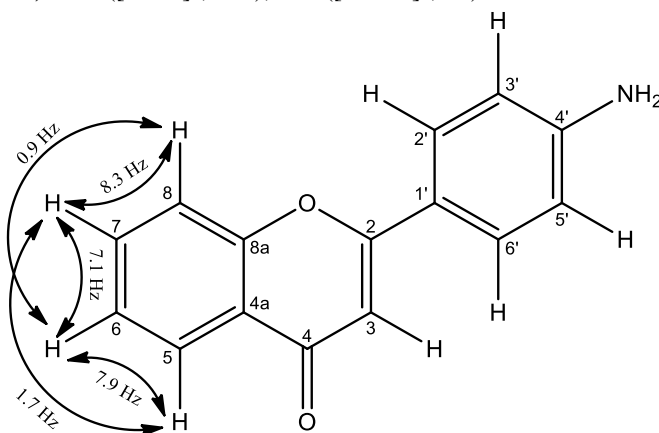
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	3,89	
H-3	s	6,78	
H-5	d	7,42	2,9
H-7	dd	7,06	2,9/8,8
H-8	d	7,42	8,8
H-2',6'	m	7,90-7,93	
H-3',5'	m	7,50-7,55	
H-4'	m	7,50-7,55	

Tabela 33 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 6-aminoflavona 6b

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	163,0	C-8	119,1
C-3	106,7	C-8a	150,0
C-4	178,5	C-1'	132,1
C-4a	124,8	C-2',6'	126,2
C-5	108,0	C-3',5'	129,0
C-6	144,0	C-4'	131,4
C-7	122,2		

## 4'-Aminoflavona (6c)

EM ESI m/z (int. rel.): 238 ([M+H]<sup>+</sup>, 100); 260 ([M+Na]<sup>+</sup>, 64)



4'-Aminoflavona (6c)

Figura 29 – Estrutura e constantes de acoplamento da 4'-aminoflavona (6c)

Tabela 34 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 4'-aminoflavona 6c

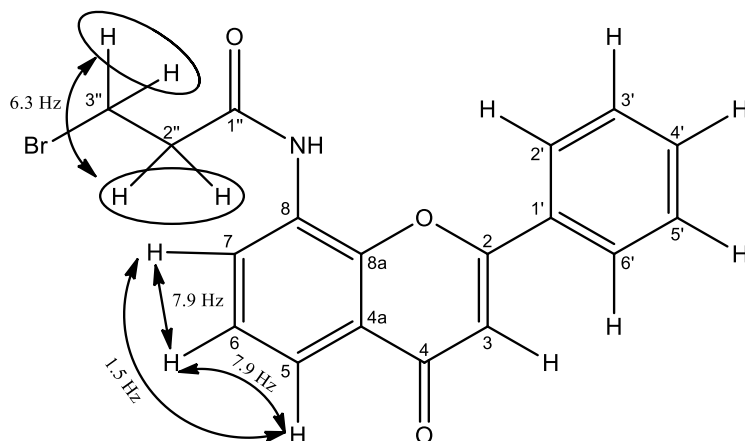
Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	J (Hz)
NH <sub>2</sub>	sl	4,22	
H-3	sl	6,67	
H-5	dd	8,21	1,7/7,9
H-6	ddd	7,39	0,9/7,1/7,9
H-7	ddd	7,66	1,7/7,1/8,3
H-8	dd	7,53	0,9/8,3
H-2',6'	dt	6,65	2,4/9,7
H-3',5'	dt	7,67	2,4/9,7

Tabela 35 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 4'-aminoflavona 6c

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	164,0	C-8a	156,2
C-3	104,3	C-1'	119,0
C-4	178,6	C-2',6'	129,1
C-4a	123,9	C-3',5'	112,6
C-5	125,5	C-4'	150,4
C-6	124,9		
C-7	133,3		
C-8	117,8		

### 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propanamida (11a)

EM/ESI *m/z* (int. rel.): 372 ([*M*+*H*]<sup>+</sup>, 100); 394 ([*M*+Na]<sup>+</sup>, 46); 410 ([*M*+K]<sup>+</sup>, 4)



3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propanamida (11a)

Figura 30 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propanamida (11a)

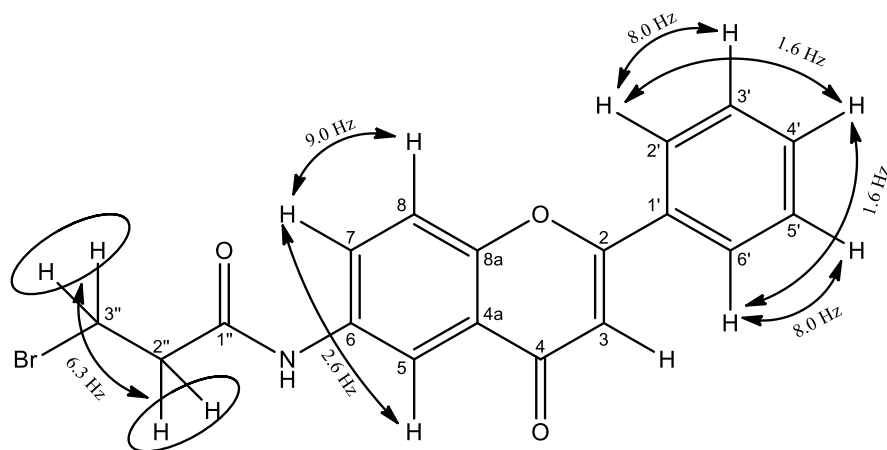
Tabela 36 – Desvios químicos de RMN de <sup>1</sup>H da 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propanamida 11a

Protão	Multiplicidade	δ (ppm)	<i>J</i> (Hz)
N-H	s	10,21	
H-3	s	7,09	
H-5	dd	7.89	1,5/7,9
H-6	t	7,49	7,9
H-7	dd	7,99	1,5/7,9
H-2',6'	m	8,17-8,21	
H-3',5'	m	7,55-7,63	
H-4'	m	7,55-7,63	
H-2''	t	3,61	6,3
H-3''	t	3,82	6,3

Tabela 37 – Desvios químicos de RMN de <sup>13</sup>C da 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-8-il)propanamida 11a

Carbono	δ (ppm)	Carbono	δ (ppm)
C-2	162,4	C-8a	148,7
C-3	107,0	C-1'	131,0
C-4	176,9	C-2',6'	126,9
C-4a	124,0	C-3',5'	129,0
C-5	121,1	C-4'	131,9
C-6	125,0	C-1''	168,9
C-7	129,4	C-2''	38,7
C-8	127,3	C-3''	29,1

### 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)propanamida (11b)



3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)propanamida (11b)

Figura 31 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)propanamida (11b)

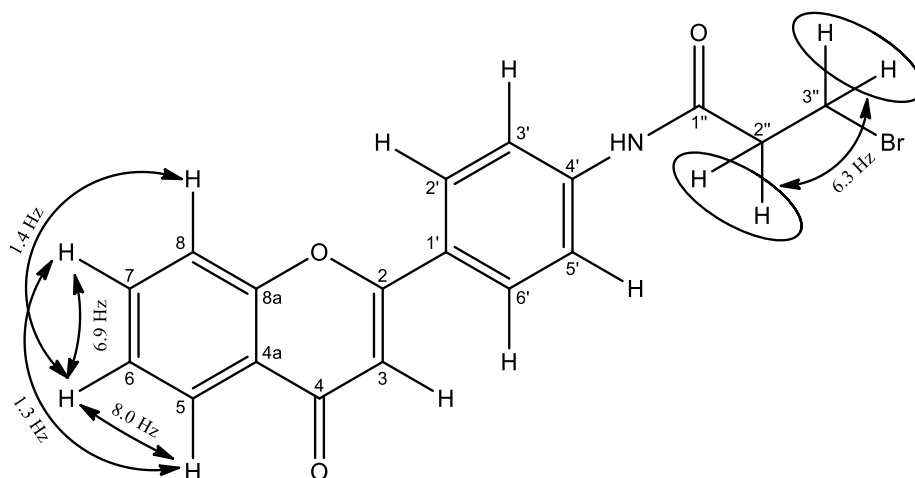
Tabela 38 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da 3-bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)propanamida 11b

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
N-H	s	10,43	
H-3	s	7,04	
H-5	d	8,38	2,6
H-7	dd	7,98	2,6/9,0
H-8	d	7,80	9,0
H-2',6'	dd	8,12	1,6/8,0
H-3',5'	m	7,58-7,65	
H-4'	m	7,58-7,65	
H-2''	t	3,01	6,3
H-3''	t	3,77	6,3

Tabela 39 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da 3-bromo-*N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)propanamida 11b

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-2	162,4	C-1'	131,2
C-3	106,5	C-2',6'	126,4
C-4	177,0	C-3',5'	129,2
C-4a	123,6	C-4'	131,8
C-5	113,3	C-1''	168,5
C-6	136,4	C-2''	38,7
C-7	125,7	C-3''	29,1
C-8	119,2		
C-8a	151,7		

### 3-Bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida (11c)



3-Bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida (11c)

Figura 32 – Estrutura e constantes de acoplamento da 3-Bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida (11c)

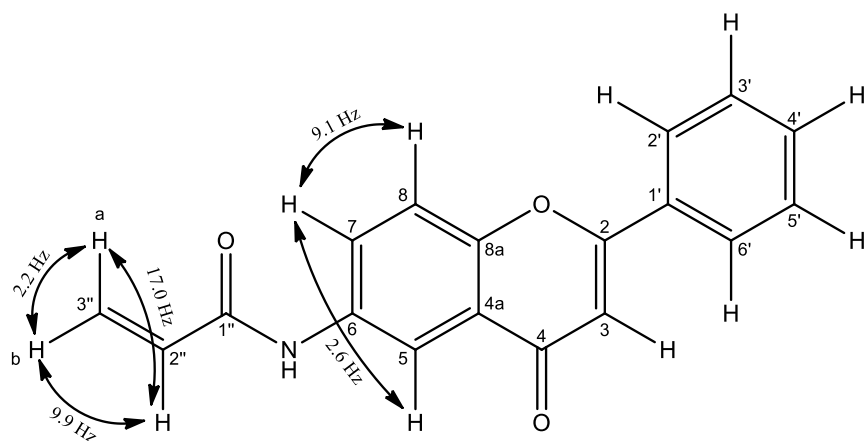
Tabela 40 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  do 3-bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida 11c

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
N-H	s	10,44	
H-3	s	6,99	
H-5	dd	8,05	1,3/8,0
H-6	ddd	7,50	1,4/6,9/8,0
H-7	m	7,77-7,87	
H-8	m	7,77-7,87	
H-2',6'	m	8,10	
H-3',5'	m	7,77-7,87	
H-2''	t	3,03	6,3
H-3''	t	3,76	6,3

Tabela 41 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  do 3-bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida 11c

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-2	162,4	C-1'	125,5
C-3	105,8	C-2',6'	127,4
C-4	177,0	C-3',5'	119,0
C-4a	123,4	C-4'	142,2
C-5	124,8	C-1''	168,8
C-6	125,5	C-2''	39,5
C-7	134,2	C-3''	29,0
C-8	118,5		
C-8a	155,6		

### ***N*-(4-Oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida (14)**



*N*-(4-Oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida (14)

Figura 33 – Estrutura e constantes de acoplamento da *N*-(4-Oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida (14)

Tabela 42 – Desvios químicos de RMN de  $^1\text{H}$  da *N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida 14

Protão	Multiplicidade	$\delta$ (ppm)	$J$ (Hz)
N-H	s	10,51	
H-3	s	7,03	
H-5	d	8,43	2,6
H-7	dd	8,07	2,6/9,1
H-8	d	7,80	9,1
H-2',6'	m	8,09-8,12	
H-3',5'	m	7,57-7,63	
H-4'	m	7,57-7,63	
H-2''	dd	6,46	9,9/17,0
H-3''a	dd	6,32	2,2/17,0
H-3''b	dd	5,80	2,2/9,9

Tabela 43 – Desvios químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *N*-(4-oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida 14

Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
C-2	162,5	C-1'	131,2
C-3	106,5	C-2',6'	126,4
C-4	177,0	C-3',5'	129,2
C-4a	123,6	C-4'	131,8
C-5	113,6	C-1''	163,4
C-6	136,5	C-2''	131,6
C-7	125,9	C-3''	127,6
C-8	119,2		
C-8a	151,8		

## 2. Atividade antibacteriana

Tabela 44 – MICs das (E)-2'-hidroxicalconas e flavanona na *Escherichia coli*

	MIC (µg/mL) <i>Escherichia coli</i>	MIC (µg/mL) <i>Listeria</i>
(E)-2'-hidroxicalcona	>128	-
(E)-4-nitro-2'-hidroxicalcona	128	N/A
(E)-3'-nitro-2'-hidroxicalcona	64	N/A
(E)-5'-nitro-2'-hidroxicalcona	128	-
(E)-4-amino-2'-hidroxicalcona	16	-
(E)-3'-amino-2'-hidroxicalcona	-	-
6-aminoflavanona	-	-

"N/A" = resultado inconclusivo; "-" = não testado

Tabela 45 – MICs das flavonas na *Escherichia coli*

	MIC (µg/mL) <i>Escherichia coli</i>	MIC (µg/mL) <i>Listeria</i>
Flavona	128	-
4'-nitroflavona	128	N/A
8-nitroflavona	8	N/A
6-nitroflavona	>128	-
4'-aminoflavona	128	N/A
8-aminoflavona	32	N/A
6-aminoflavona	>128	-

"N/A" = resultado inconclusivo; "-" = não testado

## **Discussão**

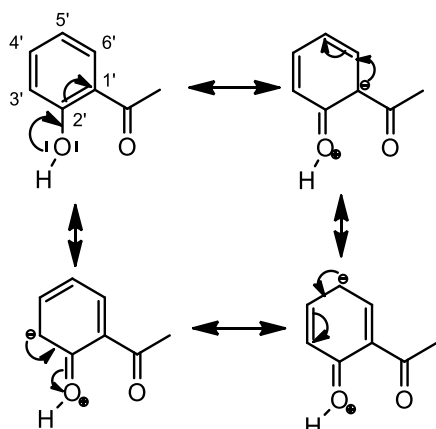




## Discussão

### 1. Síntese das 2'-hidroxiacetofenonas, (*E*)-2'-hidroxicalconas, 2'-hidroxidi-hidrocalconas, flavonas e flavanona.

Na nitração da 2'-hidroxiacetofenona, obtivemos uma mistura de dois compostos, a 2'-hidroxi-3-nitroacetofenona **2b** e a 2'-hidroxi-5-nitroacetofenona **2c** (Esquema 6), na proporção de aproximadamente 1 mol do composto **2b** para 3 moles do composto **2c**. As posições C-3' e C-5' deste composto estão igualmente ativadas pelo grupo hidroxilo (Esquema 14), indicando assim que esta diferença nas quantidades obtidas se deverá a outro fator, como por exemplo o impedimento estéreo. Uma vez que a posição 5' está mais



Esquema 14 – Estruturas de ressonância da 2'-hidroxiacetofenona

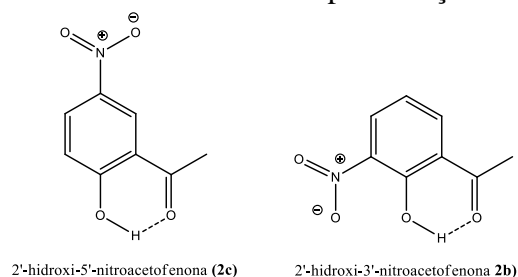
longe dos outros substituintes (mais desimpedida), em relação à posição 3', será mais fácil para um novo substituinte, em particular o grupo nitro que é um grupo volumoso, se ligar ao anel nessa posição. Face a estes resultados, podemos concluir que este método é uma opção válida para a síntese de 2'-hidroxi-5-nitroacetofenona **2c**. No entanto, será necessário otimizar o método para a síntese de 2'-hidroxi-3-nitroacetofenona, pois o rendimento obtido é muito baixo (15%).

Nas reações seguintes, síntese de derivados de 2'-hidroxicalconas, foram usados protocolos previamente desenvolvidos no nosso grupo de investigação [122–125]. No caso da 2'-hidroxi-4-nitroalcona **4c** (Esquema 7), a condensação aldólica

foi efetuada à temperatura ambiente, sob agitação, durante duas horas. Uma vez que este procedimento não resultou com os derivados nitrados no anel A (**4a-b** – Esquema 7), foi usado um procedimento alternativo onde se efetua a condensação sob radiação micro-ondas (50 W), durante 30 minutos. Mesmo assim, o rendimento da 2'-hidroxi-3'-nitroalcona **4a** foi fraco (13%). É possível que o grupo nitro na posição 3' interfira na ponte de hidrogénio entre o grupo 2'-hidroxilo e o carbonilo, diminuindo assim a acidez do hidrogénio  $\alpha$ -carbonílico (Figura 34).

A ciclodesidrogenação das 2'-hidroxinitroalconas (**4a-c** – Esquema 8) foi efetuada seguindo um protocolo simples e eficiente que possibilitou a síntese com bons rendimentos (>50%) das nitroflavonas. Esta síntese é catalisada por iodo, dado que ocorre uma adição de  $I_2$  à dupla ligação, seguida de ciclização por substituição de um átomo de iodo e eliminação de HI (Esquema 15). O iodeto libertado é transformado em  $I_2$  por atuação do DMSO, regenerando-se assim o catalisador.

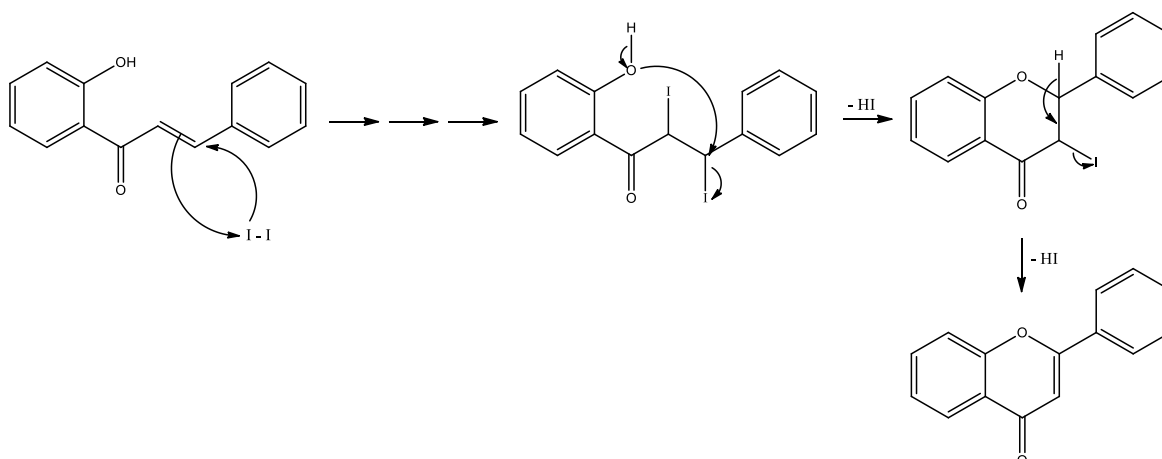
O passo seguinte consistiu na redução dos grupos nitro. No caso das nitroflavonas (**5a-c**) efetuou-se um tratamento com formato de amónio na presença de paládio em carvão ativado durante duas horas em refluxo (Esquema 9). As aminoflavonas (**6a-c**) foram obtidas em excelentes rendimentos (>75%). No caso das 2'-hidroxinitroalconas (**4a-c**), uma vez que haviam evidências de que o sistema



2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona (**2c**)

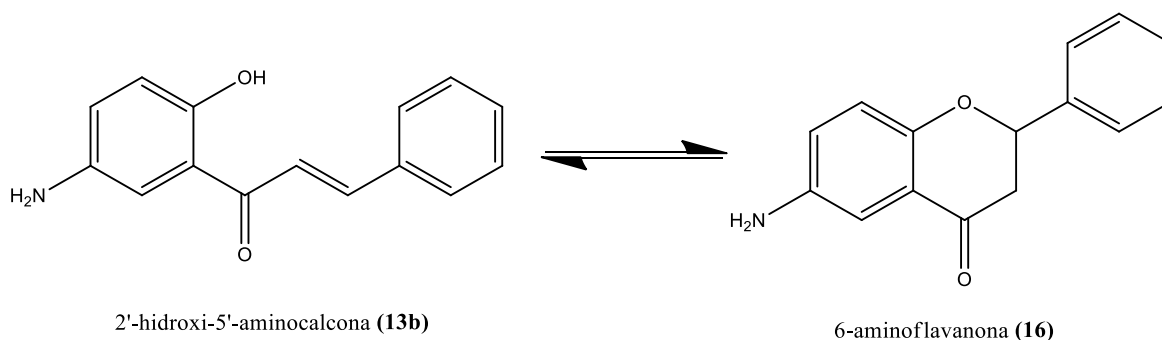
2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona (**2b**)

Figura 34 – Efeito do grupo nitro na acidez do hidrogénio  $\alpha$ -carbonílico



Esquema 15 – Mecanismo da ciclo-desidrogenação [132]

catalítico anteriormente usado poderia reduzir a dupla ligação, foi usado o sistema catalítico Sn/HCl (Esquemas 12 e 13). Foram obtidas duas das calconas pretendidas, **13a** e **13c**, (24% e 18% respectivamente) juntamente com os respectivos derivados 2'-hidroxidi-hidrocalcona **15a** e **15c** (7% e 10% respectivamente). No caso da redução do grupo nitro da calcona **4b** não foi obtido o produto pretendido, mas sim a di-hidrocalcona respectiva, **15b**, e a flavanona **16**. Tendo em conta que as 2'-hidroxicalconas podem estar em equilíbrio com as flavanonas (Esquema 16) e que este é deslocado no sentido da flavanona em meio ácido, concluímos que neste caso o meio ácido usado na reação favorece a estrutura flavanona.

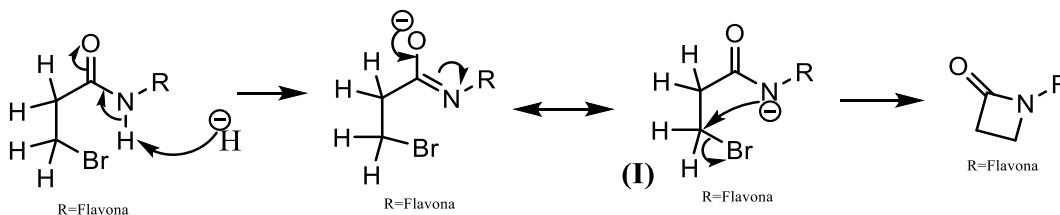


Esquema 16 – Equilíbrio 2'-hidroxicalcona-flavanona

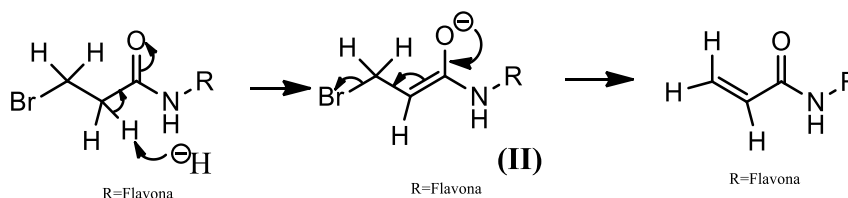
A tentativa de formar um anel  $\beta$ -lactâmico através de uma reação de Reformatsky não resultou (Esquema 3). Em todas as tentativas de síntese do derivado de imina efetuadas nunca foi possível isolar o derivado pretendido, embora a análise por TLC da reação indicasse que já não havia amina e se tinha formado um novo produto. Pensou-se que durante o tratamento final nas tentativas de purificação ocorria hidrólise da ligação imina. Mesmo nas tentativas efetuadas sem purificação e/ou com adição conjunta do bromoacetato de etilo falharam. Desta forma a primeira rota idealizada (Esquema 3) foi posta de parte e iniciou-se o estudo da segunda rota (Esquema 4).

Os derivados da 3-bromopropanamidoflavona **11a-c** foram sintetizados (Esquema 10) em rendimentos razoáveis (30%-50%) usando o cloreto de 3-bromopropionilo e uma mistura catalítica Zn-Cu, preparada *in situ* de acordo com o protocolo descrito na literatura [130].

Com o intuito de formar o anel  $\beta$ -lactâmico tratou-se a flavona **11b** com hidreto de sódio (Esquema 11). O objetivo era formar o anião (**I**), estabilizado por ressonância, que poderia em seguida atacar o carbono C-3 e substituir o bromo formando o anel  $\beta$ -lactâmico (Esquema 17). Ao fim de 24 h terminou-se a reação, tendo-se obtido um composto único em excelente rendimento (95%). No entanto a caracterização por RMN revelou que realmente tinha ocorrido a eliminação de HBr, sem formação do anel pretendido, mas com formação do grupo acrilóilo. Concluímos que o próton  $\alpha$ -carbonílico é mais ácido, promovendo a eliminação de HBr por outra via (Esquema 18).



Esquema 17 – Possível mecanismo de formação de um anel  $\beta$ -lactâmico.



Esquema 18 – Possível mecanismo de formação de uma acrilamida

## 2. Caracterização das 2'-hidroxiacetofenonas, (*E*)-2'-hidroxicalconas, 2'-hidroxi-di-hidrocalconas, flavonas e flavanona.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é reconhecidamente uma das técnicas mais importantes na elucidação estrutural de compostos. Neste trabalho, foi esta a técnica à qual recorreremos para confirmar todas as estruturas dos compostos sintetizados.

### 2'-Hidroxiacetofenonas

No decurso deste trabalho foram sintetizados 2 derivados nitrados da 2'-hidroxiacetofenona, a 2'-hidroxi-3'-nitroacetofenona **2b** (Tabelas 2 e 3) e a 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona **2c** (Tabelas 4 e 5).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , estas acetofenonas apresentam dois sinais característicos em forma de singlete:

- (i) O sinal correspondente aos prótons do grupo metilo do carbono C-2, a  $\delta$  2,71 e 2,76 ppm;
- (ii) O sinal correspondente ao próton do grupo hidroxilo que, devido ao facto de formar uma ponte de hidrogénio com o oxigénio do grupo carbonilo, aparece muito desprotegido a  $\delta$  13,18 e 12,88 ppm.

O tipo de substituição presente foi comprovado pela análise da multiplicidade dos prótons aromáticos, presentes na zona aromática ( $\delta$  aproximadamente entre  $\delta$  6,5 e 7 ppm). Os sinais característicos e o padrão de substituição da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona **2c** (Tabela 4) podem ser observados na Figura 35. Nesta figura podemos observar o singlete correspondente aos três prótons H-2 ( $\delta = 2,76$  ppm) e o singlete correspondente ao próton do grupo hidroxilo, muito desprotegido ( $\delta = 12,88$  ppm) devido à ponte de hidrogénio que forma com o oxigénio do grupo carbonilo; na zona aromática podemos identificar os

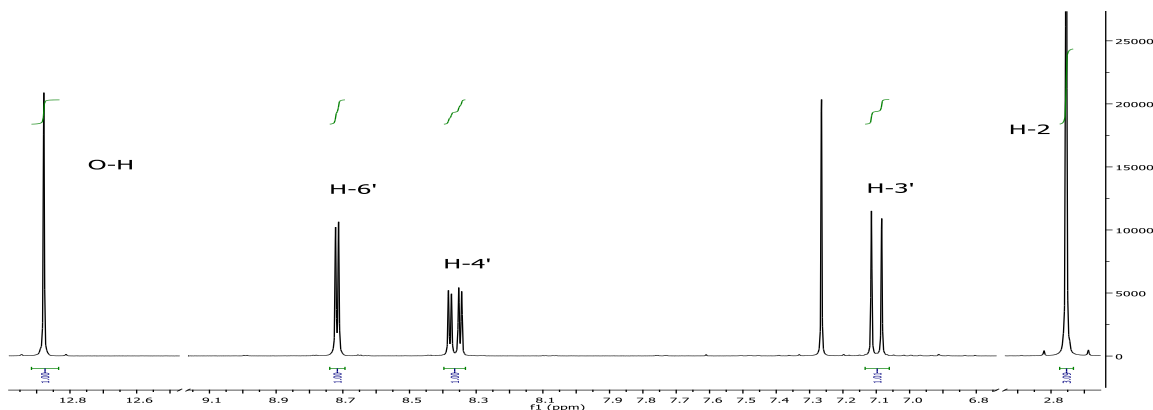
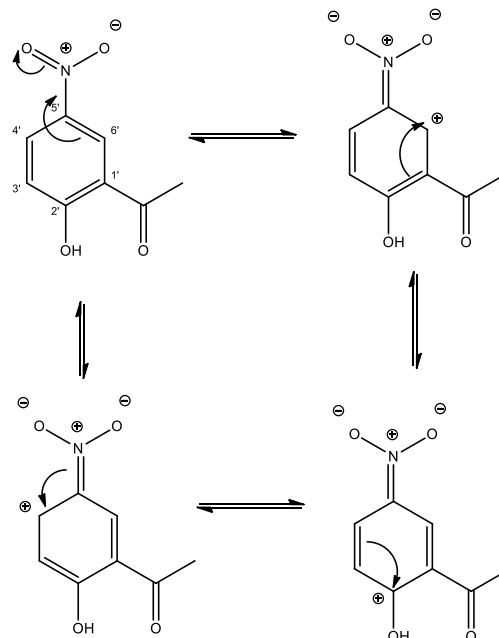


Figura 35 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona **2c**

dupletos correspondentes aos prótons H-6' e H-3' (dupletos porque estes prótons acoplam com o próton H-4') e o duplo duplete correspondente ao próton H-4' (duplo duplete porque este próton acopla com os prótons H-3' e H-6' com constantes de acoplamento diferentes). A partir deste padrão, e da desproteção dos prótons H-4' e H-6' em relação ao próton H-3', podemos concluir que a adição do grupo nitro à 2'-hidroxiacetofenona ocorreu no carbono C-5', pois um grupo nitro nesta posição irá desproteger, por ressonância (Esquema 19), os prótons H-4' e H-6'. Este efeito de desproteção também nos permite distinguir os dois dupletos, sendo que o duplete H-6' se encontra muito mais desprotegido que o duplete H-3'.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  salientam-se os sinais a  $\delta$  203,5 e 204,0 ppm, correspondentes ao carbono C-1, e a  $\delta$  27.9 e 26.8 ppm, correspondentes ao carbono C-2. Os restantes sinais foram atribuídos inequivocamente, recorrendo às conectividades dos espectros de HSQC, para os carbonos protonados, e HMBC para os carbonos quaternários. Por exemplo, para a 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona **2c** (Tabela 5), é possível distinguir os carbonos C-1', C-2' e C-5' no espectro HMBC da seguinte forma: o carbono C-1' é visto por dois prótons (H-2 e H-3'); o carbono C-2' é visto por dois prótons (H-4' e H-6'); e o carbono C-5' é apenas visto pelo próton H-3'.



Esquema 19 – Estruturas de ressonância da 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona (**2c**)

### (E)-2'-hidroxicalconas

Ao todo foram sintetizadas seis (E)-2'-hidroxicalconas diferentes, três (E)-2'-hidroxinitrocalconas **4a-c** (Tabelas 6-11) e três (E)-2'-hidroxiaminocalconas **13a-c** (Tabelas 12-15).

As principais características dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  destes compostos são:

- (i) O sinal correspondente ao próton do grupo hidroxila a valores superiores a  $\delta$  12,5 ppm, característico da presença de uma ligação de hidrogénio intramolecular (Figura 34).
- (ii) Os sinais correspondentes aos prótons vinílicos, H- $\alpha$  ( $\delta$  7.48-7.76 ppm) e H- $\beta$  ( $\delta$  7.89-7.95 ppm), cuja constante de acoplamento  $J \approx 15$  Hz confirma a configuração *E* do sistema vinílico.

No caso dos derivados com grupos amino (**13a-c**), salienta-se o sinal em forma de singlete largo a  $\delta \approx 4$  ppm. O tipo de substituição presente foi comprovado pela análise da multiplicidade dos prótons aromáticos, presentes na zona aromática ( $\delta$  aproximadamente entre 6,5 e 7 ppm). Os sinais característicos e o padrão de substituição da 2'-hidroxi-5'-nitrocalcona **4b** (Tabelas 8) podem ser observados na Figura 36. Nesta figura, é possível verificar a presença do pico correspondente ao próton O-H, o mais desprotegido de todos, bem como os prótons vinílicos H- $\alpha$  e H- $\beta$ , que são os dupletos com as maiores constantes de acoplamento. A distinção entre os prótons H- $\alpha$  e H- $\beta$  foi feita recorrendo ao espectro de HMBC: o H- $\beta$  é o único destes prótons a ver o carbono do grupo carbonilo e os carbonos C-2,6 em  $^3J$ , enquanto que o H- $\alpha$  vê os carbonos C-1' e C-1 em  $^3J$ . O padrão de substituição do anel A é semelhante ao observado na 2'-hidroxi-5'-nitroacetofenona **2c**, com um duplo duplete correspondente ao próton H-4' e dois dupletos, o mais desprotegido correspondente ao H-6' e o menos desprotegido correspondente ao H-3'. Os prótons do anel B correspondem aos dois multipletos no espectro. A partir do espectro de HMBC é possível verificar que o multiplete correspondente aos prótons H-2,6 é o único que é visto pelo carbono C- $\alpha$  em  $^3J$ . O outro multiplete, com intensidade 3, corresponde aos prótons H-3,5 e H-4.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  salientam-se os sinais a  $\delta$  192,4-194,2 ppm correspondentes ao grupo carbonilo. Os restantes sinais foram atribuídos inequivocamente, recorrendo às conectividades dos espectros de HSQC (para os carbonos protonados) e HMBC para os carbonos por identificar. Por exemplo, para a 2'-hidroxi-5'-nitrocalcona **4b** (Tabela 9) é possível identificar, no HMBC, o carbono C-1' que é visto pelos prótons H-3' e H- $\alpha$ , o carbono C-2' que é visto pelos prótons H-4' e H-6' e o carbono C-5' que é visto apenas pelo próton H-3'.

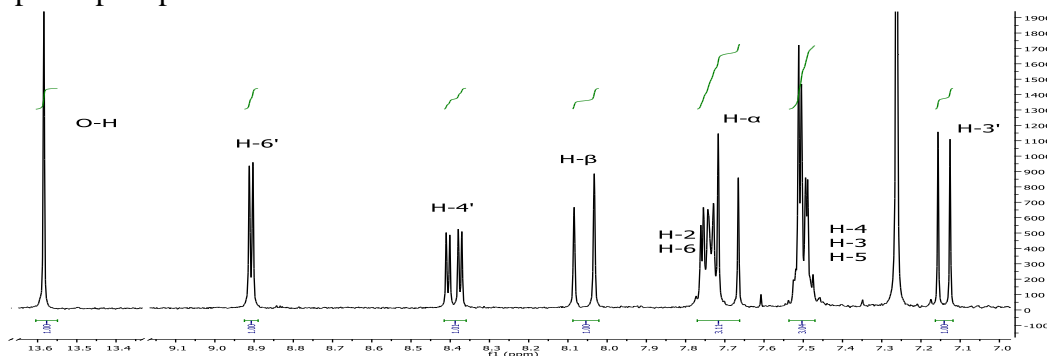


Figura 36 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 2'-hidroxi-5'-nitrocalcona **4b**

## 2'-Hidroxi-di-hidrocalconas

No decorrer deste trabalho, foram sintetizadas três di-hidrocalconas (**15a-c**). A 3'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15a** (Tabelas 16 e 17), a 5'-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15b** (Tabelas 18 e 19) e a 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15c** (Tabelas 20 e 21).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , as 2'-hidroxidi-hidrocalconas apresentam um sinal característico:

- (i) O desaparecimento do sistema vinílico e o aparecimento dos prótons H- $\alpha$  e H- $\beta$  em forma de tripleto a  $\delta \approx 3$  ppm, muito mais protegidos do que nas calconas (Figura 37).

O tipo de substituição presente foi comprovado pela análise da multiplicidade dos prótons aromáticos, presentes na zona aromática ( $\delta$  aproximadamente entre 6,5 e 7 ppm), sendo que a atribuição dos picos foi feita de forma semelhante à caracterização das calconas.

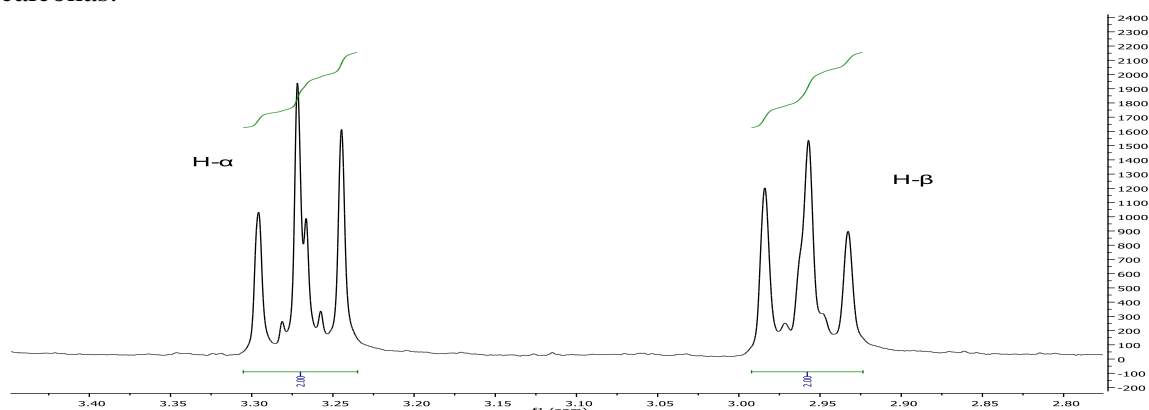


Figura 37 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15c**

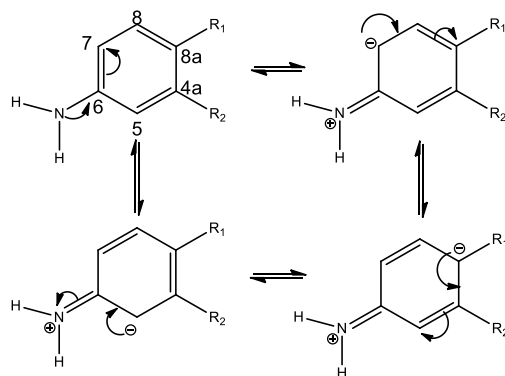
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  salientam-se os sinais a  $\delta$  204.9-206.0 ppm, correspondentes ao carbono dos grupos carbonilos, com valores de  $\delta$  superiores aos respectivos carbonos nas 2'-hidroxicalconas, e os sinais correspondentes aos carbonos C- $\alpha$  e C- $\beta$ , com  $\delta \approx 40$  e 30 ppm respectivamente. Os restantes sinais foram atribuídos inequivocamente, recorrendo às conectividades dos espectros de HSQC e HMBC. Por exemplo, para a 4-amino-2'-hidroxidi-hidrocalcona **15c** (Tabela 21) é possível identificar, através do espectro HMBC, o carbono C-1', que é visto pelos prótons H- $\alpha$  e H-3'; o carbono C-2', que é visto pelos prótons H-4' e H-6'; e o carbono H-4 que é visto apenas pelos prótons H-2,6.

## Flavonas

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , todas as flavonas sintetizadas apresentam um sinal característico:

- (i) O sinal correspondente ao próton H-3, um singlete com valores de  $\delta \approx 6,9$  ppm para as flavonas **5a-c** (Tabelas 24-29), de  $\delta \approx 6,8$  ppm para as flavonas **6a-c** (Tabelas 30-35) e de  $\delta \approx 7,0$  ppm para as flavonas **11a-b** (Tabelas 36-41) e **14** (Tabela 42 e 43).

No caso dos derivados com grupos amino (**6a-c**), salienta-se o sinal em forma de singlete largo a  $\delta \approx 4$  ppm, bem como o facto de a troca de um grupo nitro por um grupo amino causar uma deslocação de todos os picos para a direita (Figura 38). Este efeito protetor do grupo amino é mais evidente nas posições *orto* e *para* em relação ao grupo amino, onde ficam localizadas as cargas negativas nas estruturas de ressonância (Esquema 20). O tipo de substituição presente foi comprovado pela análise da multiplicidade dos prótons aromáticos, presentes na zona aromática ( $\delta$  aproximadamente entre 6.5 e 7 ppm). Os sinais característicos e o padrão de substituição da 6-nitroflavona **5b** e da 6-aminoflavona **6b** podem ser observados na Figura 38, bem como a diferença na posição dos prótons equivalentes.



Esquema 20 – Estruturas de ressonância da 6-aminoflavona

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  salientam-se os sinais a  $\delta \approx 107$  ppm e  $\delta \approx 177$  ppm, correspondentes aos carbonos C-3 e C-4 respetivamente. Os restantes sinais foram atribuídos inequivocamente, recorrendo às conectividades dos espectros de HSQC e HMBC. Por exemplo, os carbonos protonados da 6-nitroflavona **5b** (Tabela 26 e 27) foram identificados através do espectro HSQC. Por HMBC, foi possível identificar o carbono C-4<sup>a</sup> (visto pelos prótons H-3 e H-8); o carbono C-6 (visto apenas pelo próton H-8); o carbono 8a (visto apenas pelo próton H-8); o carbono C-2 (que é visto pelos prótons H-2',6'); e o carbono C-1' (visto pelos prótons H-3',5' e H-3).

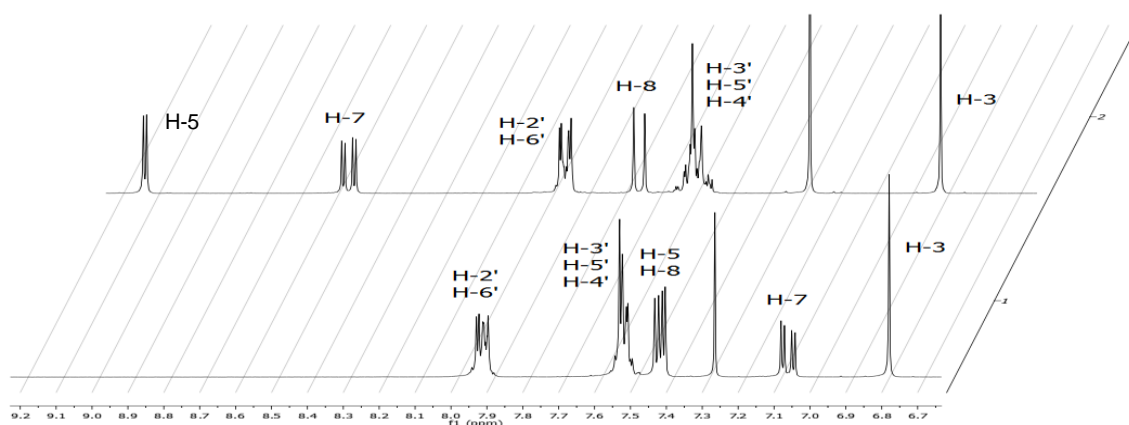


Figura 38 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 6-nitroflavona **5b** (em cima) comparado com o mesmo tipo de espectro da 6-aminoflavona **6b** (em baixo)

Os substituintes 3-bromopropanamida e acrilamida possuem também, no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , sinais característicos:



- (i) No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  das flavonas com 3-bromopropanamida como substituinte (**11a-c**), é possível encontrar não só os tripletos a  $\delta \approx 3,0$  e  $3,7$  ppm correspondentes aos prótons H-2'' e H-3'', respectivamente, como também um singlete muito desprotegido a  $\delta \approx 10$  ppm correspondente ao próton N-H (Figura 39);
- (ii) No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da flavona com acrilamida como substituinte (**14**), é possível encontrar os três duplos dupletos correspondentes aos prótons H-2'', H-3''a e H-3''b a  $\delta 5.80$ - $6.46$  ppm (Figura 40). Estes duplos dupletos são o resultado da estereoquímica da molécula, pois o próton H-2'' acopla de forma diferente com o próton H-3''a (que está em posição *trans*) da forma com que acopla com o próton H-3''b (que está em posição *cis*). Uma vez que os prótons estão “fixados” pela dupla ligação nestas posições, os prótons H-3''a e H-3''b deixam de ser equivalentes, pois estão sujeitos a um ambiente eletrónico diferente. Deste modo, a constante de acoplamento  $^3J_{HH}$  varia consoante a equação de Karplus, de modo que atinge o seu valor máximo quando acopla com prótons em posição *trans* e o seu valor mínimo quando acopla com prótons geminais [133,134].

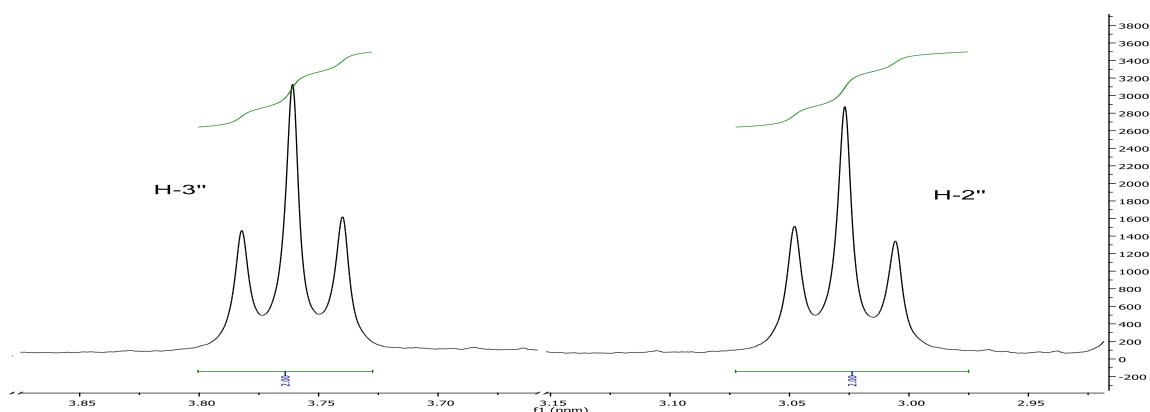


Figura 39 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da 3-Bromo-*N*-[4-(4-oxo-4*H*-cromen-2-il)fenil]propanamida 11c

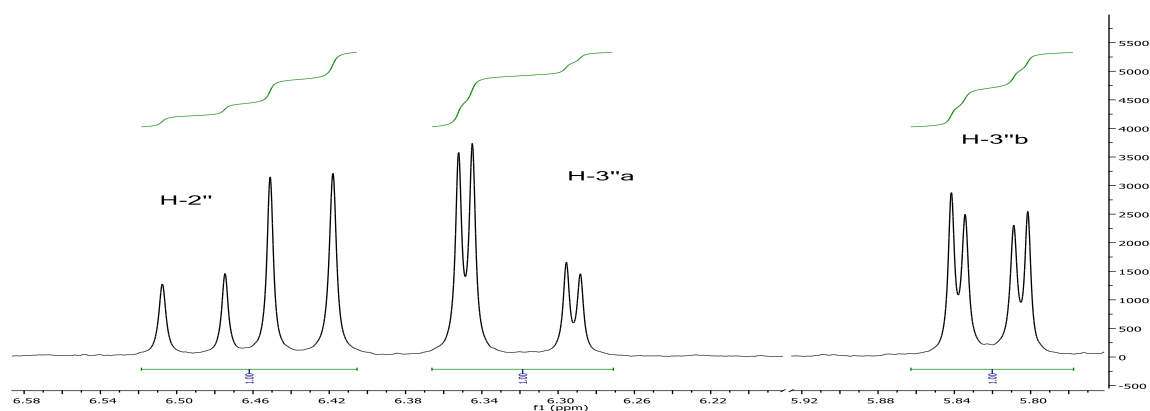


Figura 40 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da *N*-(4-Oxo-2-fenil-4*H*-cromen-6-il)acrilamida 14

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  destas últimas flavonas, destaca-se o carbonilo extra, a  $\delta$  160-170 ppm.

### **Flavanona**

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da flavanona é apenas de salientar o desaparecimento dos sinais típicos da ressonância dos prótons vinílicos, e consequente aparecimento dos duplos dupletos correspondentes aos prótons H-2, H-3a e H-3b. Estes duplos dupletos são o resultado da estereoquímica da molécula, pois o próton H-2 acopla de forma diferente com o próton H-3a (que está em posição *trans*) da forma com que acopla com o próton H-3b (que está em posição *cis*). Uma vez que os prótons estão “fixados” pelo anel C nestas posições, os prótons H-3a e H-3b não são equivalentes, pois estão sujeitos a um ambiente eletrónico diferente. Deste modo, a constante de acoplamento  $^3J_{\text{HH}}$  varia consoante a equação de Karplus, de modo que atinge o seu valor máximo quando acopla com prótons geminais e o seu valor mínimo quando acopla com prótons em posição *trans* [132,133].

### 3. Atividade Antibacteriana

Em relação aos testes de atividade antibacteriana, observou-se que esta varia dependendo de vários fatores. Para contextualizar os valores obtidos, os compostos com valores de MICs inferiores a 100 µg/mL são considerados notáveis, enquanto compostos com MICs inferiores a 10 µg/mL são considerados muito interessantes [135] (Tabelas 44 e 45). Com isto em consideração, apenas um dos compostos testados apresentou um MIC muito interessante, a 8-nitroflavona **5a** com um MIC de 8 µg/mL para a *Escherichia coli*. Por outro lado, a (*E*)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona **4a**, a (*E*)-4-amino-2'-hidroxicalcona **13c** e a 8-aminoflavona **6a** apresentaram atividades notáveis também na *Escherichia coli*. Os restantes compostos apresentaram todos atividades acima dos 100 µg/mL para o mesmo microrganismo. Contudo, apesar de os MICs serem iguais ou superiores a 128 µg/mL, este não é o seu valor “real”. Devido à natureza do protocolo usado, a MIC “real” encontra-se no intervalo entre a concentração mais baixa que demonstrou atividade e a concentração mais alta na qual houve crescimento bacteriano [131]. Isto significa que, num ensaio em que sejam testadas as concentrações 32, 64, e 128 µg/mL, um composto que apresente um MIC de 128 µg/mL terá a MIC “real” entre 64 e 128 µg/mL, ou seja, o valor real pode ser inferior ao valor medido.

Em relação aos testes da atividade antibacteriana na *Listeria*, os resultados obtidos não nos permitiram concluir nada acerca da interação dos diferentes compostos com esta estirpe. Apesar de se ter repetido várias vezes os testes, os resultados eram sempre semelhantes: uma mancha ténue no ponto de aplicação do inóculo. Nesta mancha não era possível encontrar as colónias características da *Listeria*, colocou-se então a hipótese de que os conteúdos da suspensão aplicada tinham apenas sedimentado, formando uma mancha ténue de bactérias mortas. No entanto, não era aceitável considerar este resultado como positivo para a atividade bacteriana dos compostos testados, uma vez que este resultado se observava também nos controlos negativos, onde era suposto verificar o crescimento de colónias. Estes resultados podem ser explicados por uma má qualidade da cultura bacteriana usada, isto é, as bactérias usadas podiam não ser viáveis nas alturas em

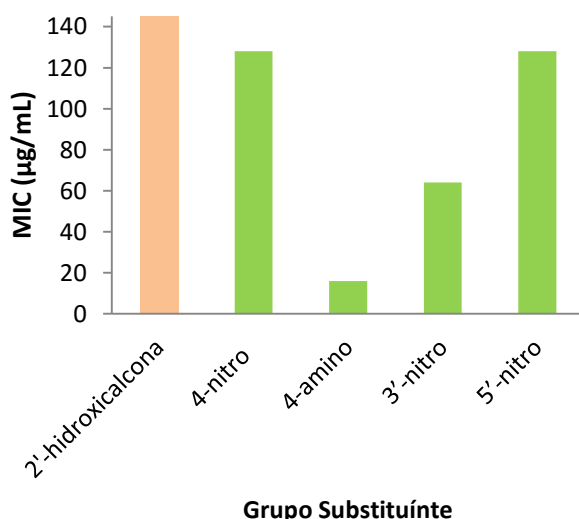


Figura 41 - Efeito dos grupos substituintes na MIC das calconas, para a *Escherichia coli*.

que as suspensões foram feitas, resultando na aplicação de uma suspensão de bactérias mortas. Outra possível explicação seria que o solvente usado, o dimetilsulfóxido (DMSO), teria um efeito bactericida sobre a *Listeria*. No entanto, existem relatos na literatura de que uma concentração de 10% de DMSO não afetam a viabilidade de uma cultura de *Listeria monocytogenes* [136]. Por esta razão, apenas obtivemos resultados para a atividade antibacteriana contra a *Escherichia coli*.

Nas (*E*)-2'-hidroxicalconas, observou-se que qualquer substituinte usado resulta numa diminuição da MIC (Figura 41), ou seja, num

aumento da atividade antibacteriana em comparação com o controle, a (*E*)-2'-hidroxicalcona. Observou-se também que o composto com a MIC mais baixa é a que tem o grupo 4-amino (Figura 41). Por fim, verificou-se que a troca de um grupo nitro por um grupo amino, na posição 4 do anel B, resulta num grande aumento da atividade antibacteriana. Apesar de na literatura existir uma quantidade razoável de trabalhos que estudam o efeito dos grupos nitro e amino em 2'-hidroxicalconas [137–140], é difícil, e e, alguns casos impossível, comparar muitos dos resultados obtidos pelos diversos grupos de investigação por diversas razões: (i) variação do microrganismo testado; (ii) variação do protocolo usado para testar a atividade, o que resulta em valores que não se podem comparar diretamente (por exemplo, não é possível comparar diretamente um valor de 12 mm do halo de inibição de um composto com um MIC de 64 µg/mL de outro); e (iii) variação da 2'-hidroxicalcona base, na qual é testado o efeito dos substituintes. No entanto, alguns dos nossos resultados são suportados por outros estudos, que sugerem que a adição de um grupo nitro na posição 3' do anel A das calconas resulta num aumento da atividade contra a *Escherichia coli* [137].

Nas flavonas, observou-se que a adição de um grupo substituinte tem diferentes efeitos consoante a posição em que o substituinte é adicionado (Gráfico 2), sendo que um substituinte na posição 6 (no anel A) reduz a atividade antibacteriana, enquanto na posição 8 (no anel A) aumenta-a de forma notável, e na posição 4' (no anel B) não a altera de forma a ser detetável por este método de avaliação. De todos os compostos testados, as flavonas com substituintes na posição 8 foram aquelas que resultaram numa maior diminuição da MIC, quer com substituinte nitro ou com substituinte amino (Figura 42). Excetuando na posição 8 das flavonas, a alteração do grupo substituinte não resultou numa alteração da sua atividade antibacteriana detetável por este método de avaliação (Figura 42).

Verificou-se também que a troca de um grupo nitro por um grupo amino, na posição 8, resulta numa diminuição da atividade antibacteriana. Apesar dos nossos resultados não apontarem para uma alteração da MIC como consequência da adição de um grupo nitro na posição 4', na literatura, é possível encontrar dados que apontam para um aumento da atividade como consequência da adição de um grupo nitro nessa posição, em flavonas [80]. O motivo pelo qual isto acontece pode estar relacionado com a diferença na sensibilidade do método usado neste trabalho. Como indicado anteriormente, apesar do valor obtido para a MIC ser 128 µg/mL, o valor “real” pode ser qualquer número entre 64 e 128 µg/mL [131].

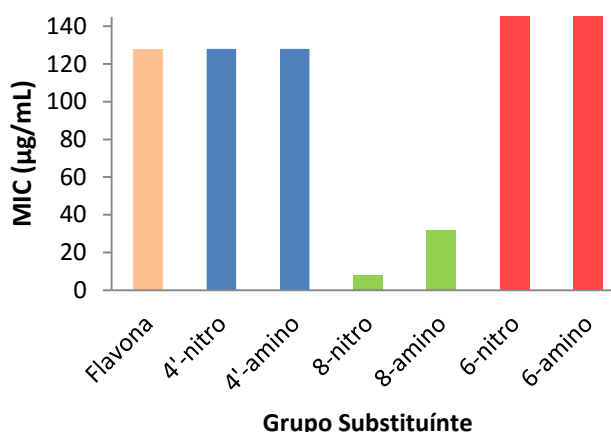


Figura 42 - Efeito dos grupos substituintes na MIC das flavonas para a *Escherichia coli*.



## **Conclusão**

---



## Conclusões e trabalhos futuros

Neste trabalho, verificou-se que a rota sintética idealizada para a obtenção das aminoflavonas **6a-c** é um método viável pois estes produtos foram obtidos em bons rendimentos, bem como os intermediários, (*E*)-2'-hidroxinitrocalconas **4a-c** e nitroflavonas **5a-c**. Para além disto, alcançaram-se ótimos rendimentos nas sínteses das flavonas **11a-c**, o que nos permite obter compostos semelhantes, em composição e estrutura, aos compostos desejados com relativa facilidade.

No entanto, são necessários mais estudos de forma a desenvolver um método de transformar as flavonas **11a-c** nas flavonas **12a-c** (Esquema 4). Isto porque as nossas tentativas de provocar esta transformação resultaram na formação da acrilamidoflavona **14**, o que aponta para uma maior acidez do protão  $\alpha$ -carbonílico em relação ao protão do N-H. São necessários também mais estudos de forma a otimizar a redução do grupo nitro das (*E*)-2'-hidroxi-calconas, pois os rendimentos obtidos foram muito baixos.

Em relação à atividade antibacteriana, conclui-se que a 8-aminoflavona **6a**, a (*E*)-2'-hidroxi-3'-nitrocalcona **4a** e a (*E*)-4-amino-2'-hidroxicalcona **13c** apresentam uma MIC notável para a *Escherichia coli* e que a 8-nitroflavona **5a** apresenta uma MIC muito interessante para o mesmo organismo. Constatou-se que nas (*E*)-2'-hidroxicalconas, a adição de um substituinte (nitro ou amino) em qualquer uma das três posições testadas (3', 5' e 4) resulta numa diminuição da MIC. Por outro lado, verificou-se que, nas flavonas, apenas os substituintes na posição 8 causam uma diminuição da MIC. No entanto, parece haver uma posição ideal, dentro das três testadas, para colocar o grupo substituinte: a posição 8 de flavonas (equivalente à posição 3' nas calconas).

Como trabalho futuro, para além de se desenvolver um método que possibilite a formação do anel  $\beta$ -lactâmico a partir dos compostos sintetizados e assim possibilitar a elaboração de um estudo de relação estrutura-atividade com este grupo funcional, será importante descobrir de que forma estes compostos, e os compostos sintetizados neste trabalho, exercem a sua atividade antibacteriana. Por exemplo, verificar se existe inibição da helicase de forma a aferir se os compostos inibem a síntese de ácidos nucleicos [78], ou averiguar se ocorre uma inibição da ATP sintase  $F_1$  como forma de provar que estes compostos inibem o metabolismo de energia [91], ou até testar a sua capacidade de alterar a permeabilidade da membrana celular [86]. Para além destes testes, um aspeto que seria interessante investigar seria o efeito destes compostos na libertação de fatores bacterianos. Isto porque, mesmo que não apresentem uma grande capacidade bactericida, a informação sobre a relação entre a estrutura e algumas atividades úteis, como a inibição da libertação de toxinas e fatores virulentos, pode ainda ser bastante útil no desenvolvimento de outros compostos.





## **Bibliografia**



1. Middleton EJ, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec 1;52(4):673–751.
2. Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med.* 1990;83(3):159–60.
3. Cushnie TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005 Nov;26(5):343–56.
4. Harborne JB, Baxter H. The handbook of natural flavonoids. Harborne JB, Baxter H, editors. Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1999.
5. Harborne JB, Williams CA. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry.* 2000 Nov;55(6):481–504.
6. Levy JR, Faber KA, Ayyash L, Hughes CL. The Effect of Prenatal Exposure to the Phytoestrogen Genistein on Sexual Differentiation in Rats. *Exp Biol Med.* 1995 Jan 1;208(1):60–6.
7. Hendrich AB. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. *Acta Pharmacol Sin.* 2006;27(1):27–40.
8. Tereschuk ML, Riera MV., Castro GR, Abdala LR. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *J Ethnopharmacol.* 1997 May;56(3):227–32.
9. Zardini EM. Ethnobotanic of Argentine Compositae with special reference to pharmacological use. *Acta Farm Bonaer.* 1984;3(2):169–94.
10. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FAM. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2000;55(1-2):70–5.
11. Fearnley J. Bee propolis - Natural Healing from the Hive. Souvenir Press Ltd., editor. London; 2001.
12. Tsao TF, Newman MG, Kwok YY, Horikoshi AK. Effect of Chinese and western antimicrobial agents on selected oral bacteria. *J Dent Res.* 1982;61(9):1103–6.
13. Gerritsen ME, Carley WW, Ranges GE, Shen CP, Phan SA, Ligon GF, Perry CA. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. *Am J Pathol.* 1995 Aug;147(2):278–92.
14. Ko H-H, Hsieh H-K, Liu C-T, Lin H-C, Teng C-M, Lin C-N. Structure-activity relationship studies on chalcone derivatives: potent inhibition of platelet aggregation. *J Pharm Pharmacol.* 2004 Oct;56(10):1333–7.
15. Teng C-M, Yu S-M, Ko F-N, Chen C-C, Wang W-C, Chen K-Y, Huang Y-L, Huang T-F. Comparison of the actions of some platelet-activating factor antagonists on platelets and aortic smooth muscles. *Eur J Pharmacol.* 1991 Nov;205(2):151–6.
16. Kunimasa K, Kuranuki S, Matsuura N, Iwasaki N, Ikeda M, Ito A, Sashida Y, Mimaki Y, Yano M, Sato M, Igarashi Y, Oikawa T. Identification of nobletin, a polymethoxyflavonoid, as an enhancer of adiponectin secretion. *Bioorg Med Chem Lett.* 2009 Apr 1;19(7):2062–4.
17. Shin J-S, Kim K-S, Kim M-B, Jeong J-H, Kim B-K. Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett.* 1999 Mar;9(6):869–74.
18. Verma AK, Pratap R. The biological potential of flavones. *Nat Prod Rep.* 2010 Nov 21;27(11):1571–93.
19. Tadera K, Minami Y, Takamatsu K, Matsuoka T. Inhibition of .ALPHA.-Glucosidase and .ALPHA.-Amylase by Flavonoids. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 2006 Jun 15;52(2):149–53.
20. Kim JS, Kwon CS, Son KH. Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2000 Nov;64(11):2458–61.
21. Gao H, Kawabata J. alpha-Glucosidase inhibition of 6-hydroxyflavones. Part 3: Synthesis and evaluation of 2,3,4-trihydroxybenzoyl-containing flavonoid analogs and 6-aminoflavones as alpha-glucosidase inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2005 Mar 1;13(5):1661–71.
22. Kato A, Nasu N, Takebayashi K, Adachi I, Minami Y, Sanae F, Asano N, Watson AA, Nash RJ. Structure-activity relationships of flavonoids as potential inhibitors of glycogen phosphorylase. *J Agric Food Chem.* 2008 Jun 25;56(12):4469–73.
23. Okuda J, Miwa I, Inagaki K, Horie T, Nakayama M. Inhibition of Aldose Reductase by 3', 4'-Dihydroxyflavones. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 1984 Feb;32(2):767–72.
24. Porcu M, Chiarugi A. The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension. *Trends Pharmacol Sci.* 2005 Mar 2;26(2):94–103.
25. Moon MJ, Lee SK, Lee J-W, Song WK, Kim SW, Kim J Il, Cho C, Choi SJ, Kim Y-C. Synthesis and structure-activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with

- CDK2 inhibitory activities. *Bioorg Med Chem*. 2006 Jan 1;14(1):237–46.
26. Murthi KK, Dubay M, McClure C, Brizuela L, Boisclair MD, Worland PJ, Mansuri MM, Pal K. Structure–activity relationship studies of flavopiridol analogues. *Bioorg Med Chem Lett*. 2000 May;10(10):1037–41.
  27. Panaro NJ, Popescu NC, Harris SR, Thorgeirsson UP. Flavone acetic acid induces a G2/M cell cycle arrest in mammary carcinoma cells. *Br J Cancer*. 1999 Aug;80(12):1905–11.
  28. Cummings J, Smyth JF. Flavone 8-acetic acid: our current understanding of its mechanism of action in solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989;24(5):269–72.
  29. Alexandrakis M, Singh L, Boucher W, Letourneau R, Theofilopoulos P, Theoharides TC. Differential effect of flavonoids on inhibition of secretion and accumulation of secretory granules in rat basophilic leukemia cells. *Int J Immunopharmacol*. 1999 Jun;21(6):379–90.
  30. Elitsur Y, Bull AW, Luk GD. Flavone acetic acid suppresses human peripheral blood lymphocyte and human colonic lamina propria lymphocyte DNA synthesis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990 Oct;57(1):96–104.
  31. Wei H, Tye L, Bresnick E, Birt DF. Inhibitory Effect of Apigenin, a Plant Flavonoid, on Epidermal Ornithine Decarboxylase and Skin Tumor Promotion in Mice. *Cancer Res*. 1990 Feb 1;50(3):499–502.
  32. Liu LF. DNA Topoisomerases: Biochemistry and Molecular Biology. In: Liu LF, editor. *Advances in Pharmacology*, vol 29A. 1994. p. 1–310.
  33. Mittra B, Saha A, Chowdhury AR, Pal C, Mandal S, Mukhopadhyay S, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med*. 2000 Jun;6(6):527–41.
  34. Ta N, Walle T. Aromatase inhibition by bioavailable methylated flavones. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007 Oct;107(1-2):127–9.
  35. Quintin J, Roullier C, Thoret S, Lewin G. Synthesis and anti-tubulin evaluation of chromone-based analogues of combretastatins. *Tetrahedron*. 2006;62(17):4038–51.
  36. Kandaswami C, Perkins E, Soloniuk DS, Drzewiecki G, Middleton EJ. Ascorbic acid-enhanced antiproliferative effect of flavonoids on squamous cell carcinoma in vitro. *Anticancer Drugs*. 1993;4(1):91–6.
  37. Rastelli G, Costantino L, Albasini A. A Model of the Interaction of Substrates and Inhibitors with Xanthine Oxidase. *J Am Chem Soc*. 1997 Apr;119(13):3007–16.
  38. McCord JM. Free radicals and myocardial ischemia: Overview and outlook. *Free Radic Biol Med*. 1988 Jan;4(1):9–14.
  39. Huk I, Brovkovich V, Nanobash Vili J, Weigel G, Neumayer C, Partyka L, Patton S, Malinski T. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia–reperfusion injury: an experimental study - Article - *British Journal of Surgery*. *Br J Surg*. 1998;85(8):1080–5.
  40. García-Mediavilla V, Crespo I, Collado PS, Esteller A, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ, González-Gallego J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol*. 2007 Feb 28;557(2-3):221–9.
  41. Hryntsevich IB, Shadyro OI. Reactions of alpha-hydroxyethyl radicals with flavonoids of various structures. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005 Oct 1;15(19):4252–5.
  42. Spach PI, Cunningham CC. Control of state 3 respiration in liver mitochondria from rats subjected to chronic ethanol consumption. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 1987 Dec;894(3):460–7.
  43. Zhongli C, Xujia Z, Jilan W. Reactions and kinetics of baicalin with reducing species, H, e<sup>-</sup>-solv and  $\alpha$ -hydroxyethyl radical in deaerated ethanol solution under  $\gamma$ -irradiation. *Radiat Phys Chem*. 1995 Feb;45(2):217–22.
  44. Li RW, Theriault AG, Au K, Douglas TD, Casaschi A, Kurowska EM, Mukherjee R. Citrus polymethoxylated flavones improve lipid and glucose homeostasis and modulate adipocytokines in fructose-induced insulin resistant hamsters. *Life Sci*. 2006 Jun 20;79(4):365–73.
  45. Liang Y-C, Tsai S-H, Tsai D-C, Lin-Shiau S-Y, Lin J-K. Suppression of inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase through activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  by flavonoids in mouse macrophages. *FEBS Lett*. 2001 May 4;496(1):12–8.
  46. Zwaagstra ME, Timmerman H, van de Stolpe AC, de Kanter FJ, Tamura M, Wada Y, Zhang MQ. Synthesis and structure-activity relationships of carboxyflavones as structurally rigid CysLT1 (LTD4) receptor antagonists. *J Med Chem*. 1998 Apr 23;41(9):1428–38.

47. Bradley D V., Cazort RJ. Relief of Bladder Spasm by Flavoxate. A Comparative Study. *J Clin Pharmacol J New Drugs*. 1970 Jan 2;10(1):65–8.
48. Chapple CR, Parkhouse H, Gardener C, Milroy EJG. Double-blind, Placebo-controlled, Cross-over Study of Flavoxate in the Treatment of Idiopathic Detrusor Instability. *Br J Urol*. 1990 Nov;66(5):491–4.
49. Li G-R, Wang H-B, Qin G-W, Jin M-W, Tang Q, Sun H-Y, Du X-L, Deng X-L, Zhang X-H, Chen J-B, Chen L, Xu X-H, Cheng L-C, Chiu S-W, Tse H-F, Vanhoutte PM, Lau C-P. Acacetin, a natural flavone, selectively inhibits human atrial repolarization potassium currents and prevents atrial fibrillation in dogs. *Circulation*. 2008 May 13;117(19):2449–57.
50. Kitamura K, Honda M, Yoshizaki H, Yamamoto S, Nakane H, Fukushima M, Ono K, Tokunaga T. Baicalin, an inhibitor of HIV-1 production in vitro. *Antiviral Res*. 1998 Feb;37(2):131–40.
51. Asres K, Seyoum A, Veeresham C, Bucar F, Gibbons S. Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother Res*. 2005 Jul;19(7):557–81.
52. Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Apr 1;50(4):1352–64.
53. Zheng WF, Tan RX, Yang L, Liu ZL. Two flavones from *Artemisia giraldii* and their antimicrobial activity. *Planta Med*. 1996 Apr;62(2):160–2.
54. Singh M, Kaur M, Silakari O. Flavones: an important scaffold for medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*. 2014 Sep 12;84:206–39.
55. Kavvadias D, Monschein V, Sand P, Riederer P, Schreier P. Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor. *Planta Med*. 2003 Feb;69(2):113–7.
56. Oteiza PI, Erlejtman AG, Verstraeten S V., Keen CL, Fraga CG. Flavonoid-membrane Interactions: A Protective Role of Flavonoids at the Membrane Surface? *Clin Dev Immunol*. 2005 Mar 1;12(1):19–25.
57. Beretz A, Joly M, Stoclet JC, Anton R. Inhibition of 3',5'-AMP Phosphodiesterase by Biflavonoids and Xanthones. *Planta Med*. 1979;36(7):193–5.
58. Liu X, Liu M, Iyanagi T, Legesse K, Lee T, Chen S. Inhibition of rat liver NAD(P)H:quinone acceptor oxidoreductase (DT- diaphorase) by flavonoids isolated from the Chinese herb *scutellariae radix* (Huang Qin). *Mol Pharmacol*. 1990 Jun 1;37(6):911–5.
59. Testa R, Taddei C, Poggesi E, Destefani C, Cotecchia S, Hieble JP, Sulpizio AC, Naselsky D, Bergsma D, Ellis C, Swift A, Ganguly S, Ruffolo RR, Leonardi A. Rec 15/2739 (SB 216469): A novel prostate selective  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonist. In: *Pharmacology Communications*. 1995. p. 79–86.
60. Hieble JP, Kolpak DC, McCafferty GP, Ruffolo RR, Testa R, Leonardi A. Effects of  $\alpha$ 1-adrenoceptor antagonists on agonist and tilt-induced changes in blood pressure: relationships to uroselectivity. *Eur J Pharmacol*. 1999 May;373(1):51–62.
61. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar;18(3):268–81.
62. Gould IM. The epidemiology of antibiotic resistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2008 Nov;32 Suppl 1:S2–9.
63. Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 2009 Aug 28;325(5944):1089–93.
64. Geddes AM, Klugman KP, Rolinson GN. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Dec;30 Suppl 2(SUPPL. 2):S109–12.
65. Cegelski L, Marshall GR, Eldridge GR, Hultgren SJ. The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jan;6(1):17–27.
66. Bagla VP, McGaw LJ, Elgorashi EE, Eloff JN. Antimicrobial activity, toxicity and selectivity index of two biflavonoids and a flavone isolated from *Podocarpus henkelii* (Podocarpaceae) leaves. *BMC Complement Altern Med*. 2014 Jan;14(1):383.
67. Xu HX, Lee SF. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. *Phytother Res*. 2001 Feb;15(1):39–43.
68. Sato Y, Suzuki S, Nishikawa T, Kihara M, Shibata H, Higuti T. Phytochemical flavones isolated from *Scutellaria barbata* and antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus*

- aureus. *J Ethnopharmacol.* 2000 Oct;72(3):483–8.
69. Chang PC, Li HY, Tang HJ, Liu JW, Wang JJ, Chuang YC. In vitro synergy of baicalein and gentamicin against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007 Feb 1;40(1):56–61.
70. Lechner D, Gibbons S, Bucar F. Modulation of isoniazid susceptibility by flavonoids in *Mycobacterium*. *Phytochem Lett.* 2008 Aug;1(2):71–5.
71. Alvarez MA, Debattista NB, Pappano NB. Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoids. *Folia Microbiol (Praha).* 2008 Jan;53(1):23–8.
72. Maia GL de A, Falcão-Silva V dos S, Aquino PGV, de Araújo-Júnior JX, Tavares JF, da Silva MS, Rodrigues LC, de Siqueira-Júnior JP, Barbosa-Filho JM. Flavonoids from *Praxelis clematidea* R.M. King and Robinson modulate bacterial drug resistance. *Molecules.* 2011 Jan 10;16(6):4828–35.
73. Fujita M, Shiota S, Kuroda T, Hatano T, Yoshida T, Mizushima T. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 2005;49:391–6.
74. Alcaráz LE, Blanco SE, Puig ON, Tomás F, Ferretti FH. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J Theor Biol.* 2000 Jul 21;205(2):231–40.
75. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, Iinuma M. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 1996 Jan;50(1):27–34.
76. Suresh Babu K, Hari Babu T, Srinivas P V, Sastry BS, Hara Kishore K, Murthy USN, Madhusudana Rao J. Synthesis and in vitro study of novel 7-O-acyl derivatives of Oroxylin A as antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005 Sep 1;15(17):3953–6.
77. Suresh Babu K, Hari Babu T, Srinivas P V, Hara Kishore K, Murthy USN, Rao JM. Synthesis and biological evaluation of novel C (7) modified chrysin analogues as antibacterial agents. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006 Jan 1;16(1):221–4.
78. Wu T, Zang X, He M, Pan S, Xu X. Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *J Agric Food Chem.* 2013 Aug 28;61(34):8185–90.
79. Wu X, Alam MZ, Feng L, Tsutsumi LS, Sun D, Hurdle JG. Prospects for flavonoid and related phytochemicals as nature-inspired treatments for *Clostridium difficile* infection. *J Appl Microbiol.* 2014 Jan 8;116(1):23–31.
80. Ullah Mughal E, Ayaz M, Hussain Z, Hasan A, Sadiq A, Riaz M, Malik A, Hussain S, Choudhary MI. Synthesis and antibacterial activity of substituted flavones, 4-thioflavones and 4-iminoflavones. *Bioorg Med Chem.* 2006 Jul 15;14(14):4704–11.
81. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Iinuma M, Tosa H, Ohkawa Y. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharmacol.* 1996 Nov;54(2-3):171–6.
82. Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull.* 1992;40(11):2970–4.
83. Ohemeng KA, Schwender CF, Fu KP, Barrett JF. DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones(1). *Bioorganic Med Chem Lett.* 1993;3(2):225–30.
84. Verghese J, Nguyen T, Oppgaard LM, Seivert LM, Hiasa H, Ellis KC. Flavone-based analogues inspired by the natural product simocyclinone D8 as DNA gyrase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013 Nov 1;23(21):5874–7.
85. Bernard FX, Sablé S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, Blanche F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(5):992–8.
86. Yao X, Zhu X, Pan S, Fang Y, Jiang F, Phillips GO, Xu X. Antimicrobial activity of nobiletin and tangeretin against *Pseudomonas*. *Food Chem.* 2012 Jun;132(4):1883–90.
87. Zhang L, Liu W, Hu T, Du L, Luo C, Chen K, Shen X, Jiang H. Structural basis for catalytic and inhibitory mechanisms of beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ). *J Biol Chem.* 2008 Feb 29;283(9):5370–9.
88. Zhang L, Kong Y, Wu D, Zhang H, Wu J, Chen J, Ding J, Hu L, Jiang H, Shen X. Three flavonoids targeting the beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Sci.* 2008 Nov;17(11):1971–8.
89. Wu D, Kong Y, Han C, Chen J, Hu L, Jiang H, Shen X. D-Alanine:D-alanine ligase as a new target for the flavonoids quercetin and apigenin. *Int J Antimicrob Agents.* 2008 Nov;32(5):421–6.
90. Neuhaus FC, Hammes WP. Inhibition of cell wall biosynthesis by analogues of alanine. *Pharmacol*

- Ther. 1981 Jan;14(3):265–319.
91. Chinnam N, Dadi PK, Sabri SA, Ahmad M, Kabir MA, Ahmad Z. Dietary bioflavonoids inhibit *Escherichia coli* ATP synthase in a differential manner. *Int J Biol Macromol*. 2010 Jun;46(5):478–86.
  92. Stapleton PD, Shah S, Hamilton-Miller JMT, Hara Y, Nagaoka Y, Kumagai A, Uesato S, Taylor PW. Anti-Staphylococcus aureus activity and oxacillin resistance modulating capacity of 3-O-acylcatechins. *Int J Antimicrob Agents*. 2004 Oct;24(4):374–80.
  93. Cushnie TPT, Hamilton VES, Chapman DG, Taylor PW, Lamb AJ. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonol galangin. *J Appl Microbiol*. 2007 Nov;103(5):1562–7.
  94. Cushnie TPT, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Aug;38(2):99–107.
  95. Cushnie TPT, Taylor PW, Nagaoka Y, Uesato S, Hara Y, Lamb AJ. Investigation of the antibacterial activity of 3-O-octanoyl(-)-epicatechin. *J Appl Microbiol*. 2008 Nov;105(5):1461–9.
  96. Vannini A. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4393–401.
  97. Zeng Z, Qian L, Cao L, Tan H, Huang Y, Xue X, Shen Y, Zhou S. Virtual screening for novel quorum sensing inhibitors to eradicate biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008 May;79(1):119–26.
  98. Raina S, De Vizio D, Odell M, Clements M, Vanhulle S, Keshavarz T. Microbial quorum sensing: a tool or a target for antimicrobial therapy? *Biotechnol Appl Biochem*. 2009 Oct;54(2):65–84.
  99. Muhammad A, Anis I, Khan A, Marasini BP, Choudhary MI, Shah MR. Biologically active C-alkylated flavonoids from *Dodonaea viscosa*. *Arch Pharm Res*. 2012 Mar;35(3):431–6.
  100. Hussain A, Perveen S, Malik A, Afza N, Iqbal L, Tareen RB. Urease inhibitory flavone glucosides from *Marrubium anisodon*. *Pol J Chem*. 2009;83(7):1329–35.
  101. Mansoor F, Anis I, Khan A, Marasini BP, Choudhary MI, Shah MR. Urease inhibitory constituents from *Daphne retusa*. *J Asian Nat Prod Res*. 2014 Jan;16(2):210–5.
  102. Xiao Z-P, Peng Z-Y, Dong J-J, He J, Ouyang H, Feng Y-T, Lu C-L, Lin W-Q, Wang J-X, Xiang Y-P, Zhu H-L. Synthesis, structure-activity relationship analysis and kinetics study of reductive derivatives of flavonoids as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2013 May;63:685–95.
  103. Xiao Z-P, Wang X-D, Peng Z-Y, Huang S, Yang P, Li Q-S, Zhou L-H, Hu X-J, Wu L-J, Zhou Y, Zhu H-L. Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. *J Agric Food Chem*. 2012 Oct 24;60(42):10572–7.
  104. Garrett DO, McDonald LC, Wanderley A, Wanderley C, Miller P, Carr J, Arduino M, Sehulster L, Anderson R, Jarvis WR. An outbreak of neonatal deaths in Brazil associated with contaminated intravenous fluids. *J Infect Dis*. 2002 Jul 1;186(1):81–6.
  105. Tombola F, Campello S, De Luca L, Ruggiero P, Del Giudice G, Papini E, Zoratti M. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Lett*. 2003 May;543(1-3):184–9.
  106. Tombola F, Carlesso C, Szabò I, de Bernard M, Reytrat JM, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. *Helicobacter pylori* vacuolating toxin forms anion-selective channels in planar lipid bilayers: possible implications for the mechanism of cellular vacuolation. *Biophys J*. 1999 Mar 3;76(3):1401–9.
  107. Iwamoto H, Czajkowsky DM, Cover TL, Szabo G, Shao Z. VacA from *Helicobacter pylori*: a hexameric chloride channel. *FEBS Lett*. 1999 Apr 30;450(1-2):101–4.
  108. Szabò I, Brutsche S, Tombola F, Moschioni M, Satin B, Telford JL, Rappuoli R, Montecucco C, Papini E, Zoratti M. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J*. 1999 Oct 15;18(20):5517–27.
  109. Tombola F, Morbiato L, Del Giudice G, Rappuoli R, Zoratti M, Papini E. The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *J Clin Invest*. 2001 Sep 15;108(6):929–37.
  110. Lee J-H, Park J-H, Cho MH, Lee J. Flavone reduces the production of virulence factors, staphyloxanthin and  $\alpha$ -hemolysin, in *Staphylococcus aureus*. *Curr Microbiol*. 2012 Dec;65(6):726–32.
  111. Holten K, Onusko E. Appropriate Prescribing of Oral Beta-Lactam Antibiotics - American Family Physician. *Am Fam Physician*. 2000;62(3):611–20.



112. Suárez C, Gudiol F. [Beta-lactam antibiotics]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009 Feb 1;27(2):116–29.
113. Tipper DJ, Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1965;54(4):1133–41.
114. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005 Oct;8(5):525–33.
115. Tomasz A. The mechanism of the irreversible antimicrobial effects of penicillins: how the beta-lactam antibiotics kill and lyse bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 1979 Jan 28;33:113–37.
116. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chem Rev*. 2005 Feb;105(2):395–424.
117. Bebrone C, Lassaux P, Vercheval L, Sohier J-S, Jehaes A, Sauvage E, Galleni M. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: focus on  $\beta$ -lactamase inhibition. *Drugs*. 2010 Apr 16;70(6):651–79.
118. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the beta-lactamase fold. *FEBS Lett*. 2001;503(1):1–6.
119. Pernot L, Chesnel L, Le Gouellec A, Croize J, Vernet T, Dideberg O, Dessen A. A PBP2x from a clinical isolate of *Streptococcus pneumoniae* exhibits an alternative mechanism for reduction of susceptibility to beta-lactam antibiotics. *J Biol Chem*. 2004;279:16463–70.
120. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56:20–51.
121. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001 Mar;46(1-3):3–26.
122. Barros AIRNA, Silva AMS, Alkorta I, Elguero J. Synthesis, experimental and theoretical NMR study of 2'-hydroxychalcones bearing a nitro substituent on their B ring. *Tetrahedron*. 2004;60(31):6513–21.
123. Barros AIRNA, Silva AMS. Efficient Synthesis of Nitroflavones by Cyclodehydrogenation of 2'-Hydroxychalcones and by the Baker-Venkataraman Method. *Monatshefte für Chemie - Chem Mon*. 2006 Dec 16;137(12):1505–28.
124. Barros AIRNA, Dias AFR, Silva AMS. Reductive coupling reactions of 2-nitrochalcones and their beta-hydroxy-analogues: New syntheses of 2-arylquinoline and 2-aryl-4-hydroxyquinoline derivatives. *Monatshefte für Chemie*. 2007;138(6):585–94.
125. Patoilo DT, Silva AMS, Cavaleiro JAS. Regioselective 3-nitration of flavones: A new synthesis of 3-nitro- and 3-aminoflavones. *Synlett*. 2010;(9):1381–5.
126. Fernández-Ibáñez MÁ, Maciá B, Alonso DA, Pastor IM. Recent Advances in the Catalytic Enantioselective Reformatsky Reaction. *European J Org Chem*. 2013 Nov;2013(31):7028–34.
127. Adrian JC, Barkin JL, Hassib L. B-Amino esters via the Reformatsky reaction: Restraining effects of the ortho-methoxyphenyl substituent. 1999;40:2457–60.
128. Baldoli C, Del Buttero P, Licandro E, Papagni A, Pilati T. Tricarbonyl( $\eta^6$ arene)Chromium(0) complexes as chiral auxiliaries: Asymmetric synthesis of  $\beta$ -aminoesters and  $\beta$ -lactams by Reformatsky condensation. *Tetrahedron*. 1996 Mar;52(13):4849–56.
129. Simas ABC, Pereira VLP, Barreto Jr. CB, Sales DL de, Carvalho LL de. An expeditious and consistent procedure for tetrahydrofuran (THF) drying and deoxygenation by the still apparatus. *Quim Nova*. 2009;32(9):2473–5.
130. LeGoff E. Cyclopropanes from an Easily Prepared, Highly Active Zinc-Copper Couple, Dibromomethane, and Olefins. *J Org Chem*. 1964;29(I):2048–50.
131. Cockerill FR, Wikler MA, Alder J, Dudley MN, Eliopoulos GM, Ferraro MJ, Hardy DJ, Hecht DW, Hindler JA, Patel JB, Powell M, Swenson JM, Thomson RB, Traczewski MM, Turnidge JD, Weinstein MP, Zimmer BL. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition. Vol. 32. 2012.
132. Silva AMS. Síntese e caracterização estrutural de flavonoides e compostos afins. Universidade de Aveiro; 1993.
133. Karplus M. Contact Electron-Spin Coupling of Nuclear Magnetic Moments. *J Chem Phys*. 1959;30(1):11.
134. Karplus M. Vicinal Proton Coupling in Nuclear Magnetic Resonance. 1963;85(18):2870–1.
135. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*. 2005;100(1-2):80–4.
136. Czuprynski CJ, Henson PM, Campbell P a. Effect of dimethyl sulfoxide on the in vitro and in vivo bactericidal activity of human and mouse neutrophils and mononuclear phagocytes. *Inflammation*.

- 1984;8(2):181–91.
137. Sivakumar PM, Seenivasan SP, Kumar V, Doble M. Synthesis, antimycobacterial activity evaluation, and QSAR studies of chalcone derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2007;17(6):1695–700.
138. Batovska D, Parushev S, Stamboliyska B, Tsvetkova I, Ninova M, Najdenski H. Examination of growth inhibitory properties of synthetic chalcones for which antibacterial activity was predicted. *Eur J Med Chem*. 2009;44(5):2211–8.
139. Wu J, Wang C, Cai Y, Peng J, Liang D, Zhao Y, Yang S, Li X, Wu X, Liang G. Synthesis and crystal structure of chalcones as well as on cytotoxicity and antibacterial properties. *Med Chem Res*. 2012;21(4):444–52.
140. Lin Y. Chalcones and flavonoids as anti-Tuberculosis agents. *Bioorg Med Chem*. 2002 Aug;10(8):2795–802.